



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113286819 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 24

(21) 申请号 201980051396.3	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2019.07.31	C07K 16/28 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113286819 A	A61K 39/395 (2006.01)
(43) 申请公布日 2021.08.20	A61P 35/00 (2006.01)
(30) 优先权数据 18306050.8 2018.08.01 EP 19153992.3 2019.01.28 EP	A61P 35/02 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.03.19	(56) 对比文件
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2019/070693 2019.07.31	US 2015353643 A1,2015.12.10
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/025703 EN 2020.02.06	US 2016175358 A1,2016.06.23
(73) 专利权人 感应检查疗法公司 地址 法国马赛 专利权人 国家医疗保健研究所 艾克斯马赛大学 让波利与艾琳卡尔梅特研究所 国家科学研究中心	CN 107249605 A,2017.10.13
(72) 发明人 A·特鲁内 D·奥利芙 C·帕赛罗 A·德盖萨特	CN 101370830 A,2009.02.18
(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256 专利代理师 孟凡宏	Vaheh Oganessian等.Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions.Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.2008,第64卷(第6期),700-704. Audrey D McConnell等.A general approach to antibody thermostabilization.MAbs.2014,第6卷(第5 期),1274-1282. David Gareth William等.Humanising Antibodies by CDR Grafting.Antibody Engineering.2010,第1卷319-339.
	审查员 王斯奇
	权利要求书1页 说明书59页 序列表35页 附图4页

(54) 发明名称 抗BTN3A抗体及其在治疗癌症或感染性病症 中的用途
(57) 摘要 本发明涉及与人BTN3A特异性结合的人源化 抗体及其在治疗癌症和感染性病症中的用途。

CN 113286819 B

1. 分离的抗BTN3A抗体,其包含SEQ ID NO:1的可变重链多肽VH和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的可变轻链多肽VL。
2. 权利要求1所述的分离的抗BTN3A抗体,其结合人BTN3A多肽。
3. 权利要求1或2所述的分离的抗BTN3A抗体,其与人BTN3A多肽结合,通过表面等离子共振测量所述结合的 K_D 为10nM或更小。
4. 权利要求1-3中任一项所述的分离的抗BTN3A抗体,其中所述抗体诱导与BTN3A表达细胞共培养中的V γ 9V δ 2-T细胞的活化,其在脱粒测定中测量的 EC_{50} 低于5 μ g/ml。
5. 权利要求1-4中任一项所述的分离的抗BTN3A抗体,其包含突变的或化学修饰的IgG1恒定区,其中当与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比时,所述突变的或化学修饰的IgG1恒定区不与Fc γ 受体结合或者与Fc γ 受体结合降低。
6. 权利要求5所述的分离的抗BTN3A抗体,其中所述突变的IgG1恒定区是IgG1三重突变体L247F、L248E和P350S。
7. 权利要求1-6中任一项所述的分离的抗BTN3A抗体,其是包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链的mAb1。
8. 药物组合物,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的抗BTN3A抗体,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。
9. 冻干制剂、预装式注射器或小瓶,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的抗BTN3A抗体。
10. 用于在宿主细胞中重组生产根据权利要求1-7中任一项的抗BTN3A抗体的表达载体,其包含至少一种编码所述抗BTN3A抗体的核酸。
11. 根据权利要求10所述的表达载体,其至少包含编码如权利要求7中所定义的mAb1的重链和轻链的核酸。
12. 包含根据权利要求10或11所述的表达载体的宿主细胞。
13. 用于生产权利要求1-7中任一项的抗BTN3A抗体的方法,其包括:(i)培养权利要求12所述的宿主细胞以通过所述宿主细胞表达所述抗体;(ii)纯化所述抗体;和(iii)回收所述抗体。

抗BTN3A抗体及其在治疗癌症或感染性病症中的用途

技术领域

[0001] 下文公开了抗BTN3A活化抗体,其特异性结合BTN3A并活化V γ 9/V δ 2T细胞的溶细胞功能。该抗体特别可用于治疗癌症病症,诸如血癌或实体瘤。本公开更具体地涉及特异性人源化抗BTN3A活化抗体,其与相应的亲本鼠抗体7.2或它们的具有Fc沉默的人IgG1或IgG4的恒定区的嵌合形式相比,具有等同或改进的性能。

背景技术

[0002] 白细胞是参与保护身体抵抗病原体的免疫系统的细胞。在这些细胞中,可列举淋巴细胞、单核细胞和树突细胞。单核细胞可以从血流迁移到其他组织并分化成组织驻留型巨噬细胞或树突细胞。树突细胞作为激活淋巴细胞的抗原呈递细胞(APC)起作用。在淋巴细胞中,T细胞可以分为 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。V γ 9-V δ 2($\gamma\delta$ T细胞的一个亚群)是免疫防御系统的重要效应子。它们直接裂解病原体感染的或异常的细胞。此外,它们通过诱导树突细胞(DC)成熟以及同型转换和免疫球蛋白的产生来调节免疫应答。免疫系统的这种重要细胞亚群受到表面受体、趋化因子和细胞因子的紧密调节。

[0003] T细胞的激活通过特化细胞的参与和趋化细胞因子的分泌来调节。双信号假设假定T细胞的活化是两个协同事件的结果。第一个是T细胞受体(TCR)和与抗原呈递细胞(APC)表面上加工的抗原复合的主要组织相容性复合物(MHC)物之间的相互作用。第二个事件是涉及CD28和B7分子的共刺激抗原非依赖性信号。共刺激信号的缺乏诱导无能和无应答,导致T细胞增殖、细胞因子分泌和细胞毒性活性的缺失。对这些途径的研究提供了对触发病理事件,诸如自身免疫或淋巴组织增生病症的认识。B7家族是一组扩展的共刺激分子(Coyle和Gutierrez-Ramos,2001;Sharpe和Freeman,2002)。B7家族属于B7-1配体(CD80)和B7-2配体(CD86):它们的受体是导致T细胞活化的CD28,和与CD28竞争并转导抑制信号的CTLA-4(CD152)(在Alegre等,2001中进行了综述)。CTLA-4缺陷小鼠中淋巴组织增生疾病的发生证明了CD152作为T细胞活化的负调节因子的关键作用。对CD152所发挥的抑制功能的重要发现来自对T细胞激活期间原初T淋巴细胞的增殖或细胞因子的产生的研究。特别地,CD152在T淋巴细胞活化后表达,并抑制PHA刺激或Ag选择后获得的CTL克隆的细胞溶解功能。B7-H1(PD-L1,CD274)和B7-DC(PD-L2,CD273),其受体是PD-1(CD279),被证明抑制T-细胞的增殖和细胞因子的分泌(在Sharpe和Pauken,2018中进行了综述)。另外,不同的研究表明PD-L1和PD-L2的参与增加T细胞的增殖和IL-10或IFN- γ 的产生。T细胞表面表达的与B7家族相关的其它分子,包括B7-H2(ICOS-L),最近鉴定的B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7,也已经被表明为免疫功能的检查点调节剂(在Ni和Dong,2017中进行了综述)。

[0004] Henry等(1999)发现编码嗜乳脂蛋白(BT)的区域位于人6号染色体上MHC I类区域的端粒位置。特别地,他们描述了编码属于Ig超家族(IgSF)的一组新的共刺激分子的两个基因Bt2和Bt3(BT2.1、BT2.2、BT2.3、BT3.1、BT3.2和BT3.3)(Linsley等,1992;Williams和Barclay,1988),并且通过序列相似性分析与B7家族相关:特别地,它们显示出与CD80和CD86的Ig-V样细胞外结构域的相似性。

[0005] BT3家族成员以不同的名字出现在文献中:BT3.1也称为BTF5 (Ruddy等,1997),或BTN3A1 (Rhodes等,2001),或最近称为CD277 (Bensussan和Olive,2005);BT3.2也称为BTF4 (Ruddy等,1997)或BTN3A2;最后,BT3.3也称为BTF3 (Ruddy等,1997)或BTN3A3 (Rhodes等,2001)。BT3具有两个Ig样细胞外结构域,其表征IgSF。

[0006] 已经提出,B7基因和MHC I型和II型基因可能具有共同的祖先基因,并且编码涉及类似功能(诸如T细胞活化)的蛋白质(Rhodes等,2001)。BT3分子已经在免疫细胞(诸如T、B和NK细胞,单核细胞和树突细胞以及造血前体和一些肿瘤性细胞系)上被发现。至于其它共刺激分子,它们的结构特征在于三个结构域:结合配体的胞外结构域、跨膜结构域和被称为B30.2(其可能参与胞内超氧化物浓度调节)的胞内结构域。迄今为止,CD277的配体仍然未知(Gu等,综述,2015)。

[0007] 至今,依赖于T细胞调节的多种治疗和疫苗接种策略已经被提出;世界上多个监管机构已经批准了几种针对CTLA-4、PD-1和PD-L1的免疫调节抗体用于临床。尽管这些药物代表了癌症治疗的重大进展,但是对于大部分对目前可用的治疗方法无反应的癌症患者人群而言,仍然存在未满足的医学需要。

[0008] 专利W02012080351A1、EP2651441A1、EP2946791A1、US20140322235、W02012080769A1涉及能够激活或抑制 γ 9V δ 2 T细胞的细胞溶解功能、细胞因子产生和增殖的针对BTN3A的各种抗体。但是,这些鼠抗体不适合于治疗的应用。事实上,为了施用于人类患者,必须对抗体进行人源化以避免免疫原性反应。

[0009] 人源化通常需要修饰框架区中的氨基酸,然而不确定能否将效力维持在与原始的鼠抗体相同的水平。当修饰紧邻CDR区的氨基酸时,这一点尤其明确(参见如Queen的专利US5,585,089)。

[0010] 尽管存在这些困难,发明人现在选择了活化mAb 7.2的特异性人源化抗体,其不仅将保持mAb 7.2亲本抗体的功能特性与预期地降低了人的免疫原性相结合,而且出人意料地展现出优异的可开发特性,诸如细胞系生产中的改进的产率、与亲本鼠抗体相比更高的热稳定性以及对酸和热应激的强抗性。此外,本文公开的人源化抗体mAb1有利地结合食蟹猴BTN3A,并且在食蟹猴灵长类动物中的耐受剂量高达100mg/kg/周,因而提供了用作人类治疗药物的优秀候选药物。

[0011] 发明简述

[0012] 因此,本文涉及分离的抗BTN3A抗体,其包含SEQ ID NO:1的可变重链多肽VH和SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的可变轻链多肽VL。该抗体是人源化抗体,特别是相对于其亲本鼠抗体具有预期的降低的免疫原性。这种分离的抗BTN3A抗体结合人BTN3A。特别地,其与人BTN3A多肽结合,通过表面等离子共振测量,其 K_D 为10nM或更小,优选 K_D 为5nM或更小。

[0013] 在特定实施方案中,根据本公开的所述抗体诱导与BTN3表达细胞共培养中 γ δ -T细胞,典型地是 γ 9V δ 2 T细胞的活化,其在脱粒测定中测量的 EC_{50} 低于5 μ g/ml,优选1 μ g/ml或更低。因此,所述抗体诱导杀伤肿瘤靶细胞,而与它们的组织来源无关。

[0014] 在特定实施方案中,所述分离的抗BTN3A抗体包含突变的或化学修饰的IgG1恒定区,其中当与具有野生型IgG1同种型恒定区的相应抗体相比时,所述突变的或化学修饰的IgG1恒定区不与Fc γ 受体结合,或者与Fc γ 受体的结合降低。典型地,所述突变IgG1恒定区为IgG1三重突变体L247F、L248E和P350S。所述分离的抗BTN3A抗体的实例是包含SEQ ID

NO:4的重链和SEQ ID NO:6的轻链的mAb1,或包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:7的轻链的mAb2。

[0015] 在其它实施方案中,本公开的所述分离的抗BTN3A抗体是单价形式抗体,优选选自Fab或scFv抗体。

[0016] 本公开的分离的抗BTN3A抗体可用作(i)治疗剂或用作(ii)诊断剂。例如,它们可用于治疗癌症,例如血癌,更具体地是淋巴瘤或白血病。在其它实施方案中,它们也可用于治疗实体瘤,更具体地是前列腺癌、卵巢癌或子宫内膜癌。或者,它们可以用于治疗感染性疾病。

[0017] 本公开还涉及药物组合物,其包含如上所述的抗BTN3A抗体,所述抗体与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体组合,其任选包含其它活性成分。

[0018] 本公开的另一方面涉及冻干制剂、预装式注射器或小瓶,其包含如上所述的抗BTN3A抗体。

[0019] 本公开还涉及用于在宿主细胞(典型地为哺乳动物宿主细胞,诸如CHO宿主细胞)中重组产生如上所述的抗BTN3A抗体的表达载体,其包含至少一种编码所述抗BTN3A抗体的核酸。该表达载体的一个实施方案至少包含编码如本文公开的mAb1的重链和轻链的核酸。本文还描述了包含该表达载体的宿主细胞。

[0020] 本文还公开了用于生产本公开的抗BTN3A抗体的方法,其包括:(i)培养如上定义的宿主细胞以通过所述宿主细胞表达所述抗体;任选地(ii)纯化所述抗体;(iii)回收所述抗体。

[0021] 本公开还涉及多特异性抗体,诸如双特异性抗体,其包含至少一个包含Fab或scFv的臂,所述Fab或scFv包括如上定义的抗BTN3A抗体的VH和VL。

[0022] 发明详述

[0023] 定义

[0024] 为了使本文更容易理解,首先定义某些术语。在整个发明详述中还阐述了其他的定义。

[0025] 如本文所用,术语“BTN3A”具有其在本领域中的一般含义。在具体实施方案中,其指人BTN3A多肽,包括SEQ ID NO:18的BTN3A1、SEQ ID NO:19的BTN3A2或SEQ ID NO:20的BTN3A3。

[0026] 本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此,术语抗体不仅涵盖完整抗体分子,而且包括抗体片段以及抗体的变体(包括衍生物)。

[0027] 在啮齿类和灵长类动物的天然抗体中,两条重链通过二硫键彼此连接,并且每条重链通过二硫键与轻链连接。有两种类型的轻链, λ 和 κ 。存在五种主要重链类别(或同型),其决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条链含有不同的序列结构域。在典型的IgG抗体中,轻链包括两个结构域,可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,统称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区决定了对抗原的结合识别和特异性。轻链(CL)和重链(CH)的恒定区结构域赋予重要的生物学性能,诸如抗体链缔合、分泌、跨胎盘转移、补体结合和与Fc受体(FcR)的结合。

[0028] Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N-末端部分,并由一条轻链和一条重链的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点和抗原决定簇之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自超变区或互补决定区(CDR)的残基组成。有时,来自非超变区或骨架区(FR)的残基可参与抗体结合位点,或影响总体结构域结构,并由此影响结合位点。互补决定区或CDR指共同决定天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三个CDR,分别命名为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。因此,抗原结合位点典型地包括六个CDR,包括来自重链和轻链V区中每一个的CDR组。骨架区(FR)是指插入CDR之间的氨基酸序列。因此,轻链和重链的可变区典型地包含4个骨架区和3个具有以下序列的CDR:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0029] 抗体可变区中的残基通常根据Kabat等人设计的系统编号。该系统在Kabat等人,1987年,美国卫生与公共服务部,美国国立卫生研究院,免疫学感兴趣的蛋白质序列中提出(Kabat等,1992,下文称为“Kabat等”)。在本说明书中使用该编号系统。Kabat残基命名并不总是直接对应于SEQ ID序列中氨基酸残基的线性编号。实际的线性氨基酸序列可能含有比在严格Kabat编号中更少或更多的氨基酸,其对应于基本可变结构域结构的结构组分(无论是骨架区还是互补决定区(CDR))的截短或插入。通过抗体序列中的同源性残基与“标准”Kabat编号序列的比对,可以确定给定抗体中氨基酸残基的正确Kabat编号。根据Kabat编号系统,重链可变结构域的CDR位于31-35号残基(H-CDR1)、50-65号残基(H-CDR2)和95-102号残基(H-CDR3)。根据Kabat编号系统,轻链可变结构域的CDR位于24-34号残基(L-CDR1)、50-56号残基(L-CDR2)和89-97号残基(L-CDR3)。

[0030] 在特定实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段,更特别地,包括如本文公开的抗体的抗原结合结构域的任何蛋白质。抗体片段包括但不限于Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗。

[0031] 如本文所用,术语“特异性”指抗体可检测地结合抗原(诸如BTN3A)上呈现的表位的能力。在一些实施方案中,其旨在表示结合外周血骨髓细胞(PBMC)上表达的人BTN3A的抗体,优选地,如在实施例(参见表4)中所测定的,其EC₅₀低于50μg/ml,更优选低于10μg/ml。在其它实施方案中,如通过实施例中确定的SPR方法测量的(参见表4),其以100nM或更低、10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、或10pM或更低的K_d结合抗原重组多肽。

[0032] “与BTN3A以外的抗原交叉反应”的抗体是指,以10nM或更低、1nM或更低、或100pM或更低的K_d结合BTN3A以外的抗原的抗体。“不与特定抗原交叉反应”的抗体是指,以100nM或更高的K_d,或1μM或更高的K_d,或10μM或更高的K_d与该抗原结合的抗体。在某些实施方案中,不与抗原交叉反应的此类抗体在标准结合测定法中对这些蛋白质显示出基本上检测不到的结合。在特定实施方案中,本文公开的人源化抗体(如mAb1),例如在Biacore测定法中所测量的,分别与SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23的食蟹猴BTN3A1、BTN3A2和BTN3A3交叉反应(参见表21)。

[0033] 如本文所用,“分离的抗体”是指基本上不含有具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性结合BTN3A的分离的抗体基本上不含特异性结合除BTN3A之外的其它抗原的抗体)。但是,特异性结合BTN3A的分离的抗体可与其它抗原(诸如来自其它物种的相关BTN3A分子)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可基本上不含其它细胞材料和/或化学品。

[0034] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指由单一分子组成的抗

体分子的制剂。单克隆抗体组合物对特定表位显示单一结合特异性和亲和力。

[0035] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0036] 如本文所用,术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文所用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。

[0037] 本文所用的术语“ K_d ”是指解离常数,其由 K_d 与 K_a 的比率(即 K_d/K_a)获得,并由摩尔浓度(M)表示。抗体的 K_d 值可以使用本领域已知的方法来测定。一种测定抗体 K_d 的方法是通过使用表面等离子体共振,或使用生物传感器系统(诸如Biacore[®]系统)。

[0038] 特异性可进一步表现为,例如,结合特异性抗原的亲和力/亲合力与非特异性结合其他不相关分子(在这种情况下,特异性抗原为BTN3A多肽)的亲和力/亲合力的比为约10:1、约20:1、约50:1、约100:1、10,000:1或更大。如本文所用,术语“亲和力”是指抗体与表位结合的强度。

[0039] 如本文所用,术语“亲合力”是指抗体-抗原复合物的总体稳定性或强度的信息量度。它受三个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原和抗体的滴度;以及相互作用部分的结构分布。最终,这些因素限定了抗体的特异性,即特定抗体与精确抗原表位结合的可能性。

[0040] 如本文所用,术语“活化抗体”指能够直接或间接诱导效应细胞的免疫功能的抗体。特别地,如本文所用,活化的抗BTN3A抗体至少具有诱导与BTN3表达细胞共培养中 $\gamma\delta$ T细胞,典型地是V γ 9V δ 2 T细胞的活化的能力,其在下文实施例所述的脱粒实验中测量的 EC_{50} 低于5 μ g/ml,优选1 μ g/ml或更低。

[0041] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人的动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0042] 如本文所用,术语“优化的”是指使用生产细胞或生物体,通常是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞中优选的密码子,改变核苷酸序列以编码氨基酸序列。将优化的核苷酸序列工程化以完全或尽可能多地保留由起始核苷酸序列最初编码的氨基酸序列。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为优化的。

[0043] 如本文所用,考虑到空位的数目和每个空位的长度,两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数(即, %同一性 = 相同位置的数目/位置的总数 $\times$ 100),其需要被引入以实现两个序列的最佳比对。如下所述,可以使用数学算法完成序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定。

[0044] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用E.Meyers和W.Miller的算法(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17,1988)来确定,该算法已经被引入ALIGN程序(version 2.0),其使用PAM120重量残基表,空位长度罚分12和空位罚分4。或者,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453,1970)算法来确定,该算法已并入GCG软件包的GAP程序中(可获自<http://www.gcgc.com>),使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0045] 两个核苷酸氨基酸序列之间的同一性百分比也可使用例如算法(诸如用于核酸序列的BLASTN程序)来确定,其使用字长(W)为11、期望值(E)为10、M=5、N=4以及两条链的比较作为默认值。

[0046] 重组人源化抗BTN3A活化抗体

[0047] 本公开的抗体包括选择的人源化重组抗体mAb1、mAb2、mAb4和mAb5,其结构特征在于它们的可变的重链和轻链氨基酸序列以及人恒定区(同型),如下表1所述:

[0048] 表1:mAb1-mAb6的可变的重链和轻链氨基酸序列

抗体	VH 氨基酸序列	VL 氨基酸序列	同型恒定区
mAb1	SEQ ID NO:1 (VH2 7.2)	SEQ ID NO:2 (Vk1 7.2)	沉默 IgG1 L247F/L248E/P350S
mAb2	SEQ ID NO:1 (VH2 7.2)	SEQ ID NO:3 (Vk2 7.2)	沉默 IgG1 L247F/L248E/P350S
[0049] mAb3	来自 20.1 的人源 化变体	来自 20.1 的人 源化变体	沉默 IgG1 L247F/L248E/P350S
mAb4	SEQ ID NO:1 (VH2 7.2)	SEQ ID NO:2 (Vk1 7.2)	IgG4 S241P/L248E
mAb5	SEQ ID NO:1 (VH2 7.2)	SEQ ID NO:3 (Vk2 7.2)	IgG4 S241P/L248E
mAb6	与 mAb3 相同	与 mAb3 相同	IgG4 S241P/L248E

[0050] mAb3和mAb6是另一对亲本鼠抗BTN3A抗体的人源化抗体,称为mAb 20.1,并描述于W02012/080351中,用作比较例。

[0051] 用于产生mAb1至mAb6的IgG1、IgG4及其突变体形式IgG1 L247F/L248E/P350S和IgG4 S241P/L248E的恒定同型区的相应氨基酸和核苷酸编码序列是本领域公知的(Oganesyan等,2008;Reddy等,2000)。IgG中发现的C端赖氨酸可以自然裂解,这种修饰不会影响抗体的性能;因此,该残基可以另外在mAb1至mAb6的构建体中缺失。

[0052] 下表2中示出了mAb1、mAb2、mAb4和mAb5的全长轻链和重链以及相应的编码序列。

[0053] 表2:全长重链和轻链以及DNA编码序列

[0054]	抗体	氨基酸序列	DNA 编码序列
	mAb1	重链: SEQ ID NO:4 轻链: SEQ ID NO:6	重链: SEQ ID NO:8 轻链: SEQ ID NO:10
	mAb2	重链: SEQ ID NO:4 轻链: SEQ ID NO:7	重链: SEQ ID NO:8 轻链: SEQ ID NO:11
	mAb4	重链: SEQ ID NO:5 轻链: SEQ ID NO:6	重链: SEQ ID NO:9 轻链: SEQ ID NO:10
	mAb5	重链: SEQ ID NO:5 轻链: SEQ ID NO:7	重链: SEQ ID NO:9 轻链: SEQ ID NO:11

[0055] 表3中示出了根据本公开的一些抗体的VH CDR1(也称为HCDR1)、VH CDR2(也称为HCDR2)、VH CDR3(也称为HCDR1)、VL CDR1(也称为LCDR1)、VL CDR2(也称为LCDR2)、VL CDR3(也称为HCDR3)的氨基酸序列的实例。

[0056] 在表3中,用Kabat编号(Kabat等,1992,下文称为“Kabat等”)来描述本公开的抗体的CDR区。

[0057] 为了易于阅读,以下分别将CDR区称为HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0058] 表3:根据Kabat编号的mAb1、mAb2、mAb4和mAb5及亲本鼠mAb 7.2抗体的CDR区

[0059]	原始抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
	mAb 7.2						
	mAb1	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	mAb2	NO: 12	NO: 13	NO: 14	NO: 15	NO: 16	NO: 17
	mAb4						
	mAb5						

[0060] 在一个特定实施方案中,如上文所定义的所述重组抗BTN3A抗体具有以下一种或多种性能:

[0061] (i) 例如如以下实施例所述,其以通过SPR测定的10nM或更小的 K_D ,优选地以1nM或更小的 K_D 结合BTN3A;

[0062] (ii) 例如如以下实施例所述,其以通过SPR测定的100nM或更小的 K_D ,优选以10nM或更小的 K_D 与食蟹猴BTN3A交叉反应;

[0063] (iii) 如以下实施例所述,其以通过流式细胞仪测定的50 μ g/ml或更低,优选为10 μ g/ml或更低的 EC_{50} 结合人PBMC;

[0064] (iv) 其诱导与BTN3表达细胞共培养中 $\gamma\delta$ -T细胞,典型地为V γ 9V δ 2 T细胞的活化,其在以下实施例所述的脱粒试验中测量的 EC_{50} 低于5 μ g/ml,优选为1 μ g/ml或更低。

[0065] 在可与前述实施方案组合的某些实施方案中,本文提供的抗体是上述定义的抗体的抗体片段。

[0066] 抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、Unibody和scFv片段、双抗、单域或纳米抗体和其他片段。

[0067] 优选地,它是单价抗体,诸如scFv片段的Fab。

[0068] 术语“双抗”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含与同一条多肽链(VH-VL)中的轻链可变域(VL)连接的重链可变域(VH)。通过使用太短以至于不允许同一条链上两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0069] 单域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变域或全部或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见如美国专利号6,248,516B1)。

[0070] 抗体片段可以通过多种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过本文所述的重组宿主细胞产生。

[0071] 本公开的抗体是人源化抗体。典型地,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时具有与亲本非人抗体至少相同的亲和力(或更高的亲和力)。在优选实施方案中,本文公开的抗体是如W02012/080351中公开的亲本抗体mAb 7.2的人源化抗体。比较例包括如W02012/080351中公开的亲本抗体mAb 20.1的人源化抗体。

[0072] 通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中CDR(或其部分)衍生自非人抗体,例如鼠mAb 7.2,以及FR(或其部分)衍生自具有突变以降低免疫原性的鼠抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。

[0073] 优选地,根据本公开的重组抗体是人源化沉默抗体,典型地是人源化沉默IgG1或IgG4抗体。

[0074] 如本文所用,术语“沉默”抗体是指,如实施例中所所述的,如结合测定法测量的,显示无或低Fc γ R结合和/或C1q结合的抗体。

[0075] 在一个实施方案中,术语“无或低Fc γ R和/或C1q结合”是指,与具有野生型人IgG1或IgG4同型的相应抗体观察到的Fc γ R和/或C1q结合相比,沉默抗体表现出的Fc γ R和/或C1q结合至少低50%,例如低80%。

[0076] 骨架或Fc工程化

[0077] 与相应的鼠抗体mAb 7.2相比,本公开的抗体包括对VH和VL中的骨架残基进行的修饰,以降低抗体的免疫原性。

[0078] 在一个特定实施方案中,本公开的抗体是亲本鼠抗体mAb 7.2的人源化单克隆抗体,其在VH骨架区中至少包括以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;并且在V κ 骨架区中至少包括以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;D70G;F73L;Q100G。

[0079] 在另一个特定实施方案中,本公开的抗体是亲本鼠抗体mAb 7.2的人源化单克隆抗体,其与mAb 7.2相比,在VH骨架区中至少包含以下氨基酸突变:V5Q;V11L;K12V;R66K;S74F;I75S;E81Q;S82AR;R82BS;R83T;D85E;T87S;L108S;并且在V κ 骨架区中至少包括以下氨基酸突变:T5N;V15L;R18T;V19I;K42N;A43I;S63T;D70G;F73L;Q100G。

[0080] 除了在骨架区内进行的修饰之外,本公开的抗体可以被工程化以包括Fc区内的修饰,典型地以改变抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/

或抗原依赖性细胞毒性。

[0081] 此外,本公开的抗体可以被化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以被连接至抗体)或被修饰以改变其糖基化,再次改变抗体的一种或多种功能特性。这些实施方案中的每一个详细描述于下文。

[0082] 如本文所用,术语“同型恒定区”或“Fc区”可互换使用以定义免疫球蛋白重链的C-末端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。人IgG重链Fc区通常被定义为包含从位置C226或从P230到IgG抗体的羧基末端的氨基酸残基,其中编号根据EU编号系统。Fc区的C末端赖氨酸(残基K447)可以被去除,例如在抗体生产或纯化过程中或其相应的密码子在重组构建体中被去除。因此,本公开的抗体组合物可以包含去除了所有K447残基的抗体群体、没有去除K447残基的抗体群体以及具有带有和不带有K447残基的抗体混合物的抗体群体。

[0083] 在一个特定实施方案中,修饰CH1的铰链区,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。Bodmer等人的美国专利号5,677,425中进一步描述了这种途径。例如,CH1的铰链区中的半胱氨酸残基的数目被改变,以促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

[0084] 在另一个实施方案中,抗体的Fc铰链区被突变以减少抗体的生物学半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域,使得相对于天然Fc-铰链域SpA结合,抗体具有受损的葡萄球菌蛋白A (SpA) 结合。这种途径更详细地描述于Ward等人的美国专利号6,165,745中。

[0085] 在又一个实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,以使抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应配体可以是,例如,Fc受体或补体的C1组分。该途径更详细地描述于Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0086] 在另一个实施方案中,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸,使得抗体改变了C1q结合和/或减少或消除了补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种途径更详细地描述于Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[0087] 在另一个实施方案中,一个或多个氨基酸残基被改变,从而改变抗体固定补体的能力。这种途径进一步描述于Bodmer等人的PCT公开W094/29351中。

[0088] 在其他实施方案中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区,以降低抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或降低抗体对Fc γ 受体的亲和力。具有降低的效应子功能,特别是降低的ADCC的此类抗体包括沉默抗体。

[0089] 在某些实施方案中,使用IgG1同型的Fc结构域。在某些特定实施方案中,使用IgG1 Fc片段的突变体变体,例如,沉默的IgG1 Fc,可降低或消除融合多肽介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或与Fc γ 受体结合的能力。

[0090] 在某些实施方案中,使用IgG4同型的Fc结构域。在某些特定实施方案中,使用IgG4 Fc片段的突变体变体,例如,沉默的IgG4 Fc,其降低或消除了融合多肽介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或结合Fc γ 受体的能力。

[0091] 沉默的效应子功能可以通过抗体的Fc恒定部分的突变获得,并且描述于现有技术中(Baudino等,2008;Strohl,2009)。沉默IgG1抗体的实例包括三重突变体变体IgG1 L247F

L248E P350S。沉默IgG4抗体的实例包括双重突变体IgG4 S241P L248E。

[0092] 在某些实施方案中,Fc结构域是沉默的Fc突变体,其防止在Fc结构域的位置314处的糖基化。例如,Fc结构域在位置314处含有天冬酰胺的氨基酸取代。该氨基酸取代的实例是用甘氨酸或丙氨酸替代N314。

[0093] 在又一个实施方案中,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制备无糖基化的抗体(即该抗体未糖基化)。例如,可以改变糖基化,以增加抗体对抗原的亲合力。例如,可以通过改变抗体序列内一个或多个糖基化位点,来完成该糖修饰。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致一个或多个可变区骨架的糖基化位点的消除,从而消除该位点的糖基化。该无糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。这种途径更详细地描述于Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0094] 本公开关注的本文抗体的另一种修饰是聚乙二醇化或羟乙基化或相关技术。例如,抗体可被聚乙二醇化,以增加抗体的生物学(例如血清)半衰期。为了聚乙二醇化抗体,在其中一个或多个聚乙二醇(PEG)基团附着于抗体或抗体片段的条件下,抗体或其片段典型地与PEG,诸如PEG的反应性酯或醛衍生物反应。聚乙二醇化可以通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”是指涵盖已用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG,诸如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体是无糖基化的抗体。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且可以应用于本公开的抗体。例如,参见Nishimura等人的EP0154316和Ishikawa等人的EP0401384。

[0095] 另一可能性是至少本公开的抗体的抗原结合区与能够结合血清蛋白的蛋白的融合,该人血清白蛋白提高了所得分子的半衰期。例如,这种途径描述于Nygren等人的EP0486525中。

[0096] 在某些实施方案中,通常呈现于人IgG重链恒定结构域上的C末端赖氨酸被工程化以降低异质性,这是由于这种降低的裂解通常在生产或储存期间观察到。该修饰不会可感知地改变这些抗体的所需功能,同时赋予这些分子在稳定性方面的益处。

[0097] 编码本公开的抗体的核酸分子

[0098] 本文还公开了编码本发明的抗BTN3A抗体的核酸分子。可变轻链和重链核苷酸序列的实例是编码mAb1、mAb2、mAb4和mAb5中的任一个的可变轻链和重链氨基酸序列的那些(后者序列很容易从表1和表2得到),并且使用遗传密码,并且任选地根据宿主细胞的种类考虑密码子偏倚。

[0099] 本公开内容还涉及衍生自后者序列的核酸分子,该序列针对哺乳动物细胞(例如CHO细胞系)中的蛋白质表达而被优化。

[0100] 核酸可以存在于全细胞中、细胞裂解物中、或者可以是部分纯化或基本上纯化的形式的核酸。当通过包括碱性/SDS处理、CsCl带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和其他本领域众所周知的方法(Ausubel等,1988)在内的标准技术将核酸从其他细胞组分或其他污染物(例如其他细胞核酸或蛋白质)中纯化出来时,核酸是“分离的”或“使得基本上纯化的”。例如,本公开的核酸可以是DNA或RNA,可以含有或不含有内含子序列。在一个实施方案中,核酸可以存在于载体(诸如噬菌体展示载体)中,或重组质粒载体中。

[0101] 可以使用标准分子生物学技术获得本公开的核酸。一旦获得编码,例如VH和VL片

段的DNA片段,就可以通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,例如将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,将编码VL或VH的DNA片段(例如表1中定义的VL和VH)可操作地连接至另一个DNA分子,或编码另一个蛋白的片段,诸如抗体恒定区或柔性连接子。如本文所用的,术语“可操作地连接”是指两个DNA片段以功能性方式连接,例如,使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在骨架内,或使得蛋白质在所需启动子的控制下表达。

[0102] 通过将编码VH的DNA可操作地连接至编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一个DNA分子,可以将编码VH区的分离的DNA转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(Kabat等,1992),并且可以通过标准PCR扩增获得涵盖这些区域的DNA片段。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。在一些实施方案中,重链恒定区选自IgG1同型,例如人IgG1同型。在其他实施方案中,重链恒定区选自IgG4同型,例如人IgG4同型。对于Fab片段重链基因,可以将编码VH的DNA可操作地连接至仅编码重链CH1恒定区的另一个DNA分子。

[0103] 通过将编码VL的DNA可操作地连接至编码轻链恒定区CL的另一DNA分子,可以将编码VL区的分离的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(Kabat等,1992),并且可以通过标准PCR扩增获得涵盖这些区域的DNA片段。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0104] 为获得scFv基因,将编码VH和VL的DNA片段可操作地连接至另一个编码柔性接头的片段,例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)₃的片段,使得VH和VL序列可以被表达为连续的单链蛋白,VL和VH区通过柔性接头连接(Bird等,1988;Huston等,1988;McCafferty等,1990)。

[0105] 生产单克隆抗体的转染瘤的产生

[0106] 可以使用如本领域公知的重组DNA技术和基因转染方法的联合,在宿主细胞转染瘤中生产本公开的抗体(Morrison,1985)。

[0107] 例如,为表达抗体或其抗体片段,可以通过标准分子生物学或生物化学技术(例如DNA化学合成、PCR扩增或使用表达目标抗体的杂交瘤的cDNA克隆)获得编码部分或全长轻链和重链的DNA,以及可以被插入表达载体,使得基因可操作地连接到转录和翻译控制序列的DNA。在本文中,术语“可操作地连接”是指将抗体基因连接到载体中,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其预期的调节抗体基因的转录和翻译的功能。选择表达载体和表达控制序列以使其与所用的表达宿主细胞相容。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独的载体中,或更典型地,将两种基因插入相同的表达载体中。通过标准方法将抗体基因插入表达载体中(例如,将抗体基因片段上的互补限制性位点和载体连接,或者如果不存在限制性位点,则平端连接)。

[0108] 通过将本文所述抗体的轻链和重链可变区插入已编码所需同型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,所述抗体的轻链和重链可变区用于构建任何抗体同型的全长抗体基因,从而使VH片段可操作地连接至载体内的CH片段,并且使VL片段可操作地连接至载体内的CL片段。另外地或可替代地,重组表达载体可以编码促进从宿主细胞分泌抗体链的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体中,从而使信号肽与抗体链基因的氨基末端在骨架区内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0109] 除抗体链基因外,本文公开的重组表达载体还带有控制抗体链基因在宿主细胞中的表达的调控序列。术语“调控序列”是指包括控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。例如,这类调控序列描述于Goeddel的出版物(Goeddel,1990)中。本领域技术人员将理解,表达载体的设计,包括调节序列的选择,可取决于如待转化的宿主细胞的选择,所需蛋白质的表达水平等因素。哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白表达的病毒元件,诸如衍生自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤的启动子和/或增强子。或者,可以使用非病毒调节序列,诸如泛素启动子或P-globin启动子。更进一步,调节元件由来自不同来源的序列组成,诸如SRa启动子系统,其含有来自SV40早期启动子和人T细胞白血病病毒1型的长末端重复的序列(Takebe等,1988)。

[0110] 除抗体链基因和调节序列之外,本文公开的重组表达载体可以携带其他序列,诸如调节在宿主细胞中载体复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已引入载体的宿主细胞(例如,参见Axel等人的美国专利4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,典型地,选择标记基因赋予已引入载体的宿主细胞对药物(诸如G418、潮霉素或氨甲蝶呤)的抗性。可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于带有甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。

[0111] 为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”的各种形式涵盖了通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞中的多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。从理论上讲,有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体。讨论了抗体在真核细胞,例如哺乳动物宿主细胞、酵母或丝状真菌中的表达,因为这种真核细胞,特别是哺乳动物细胞比原核细胞更可能组装和分泌适当折叠的且具有免疫活性的抗体。

[0112] 在一个特定实施方案中,根据本公开的克隆或表达载体包含可操作地连接至合适的启动子序列的mAb1、mAb2、mAb4和mAb5中任一个的重链和轻链的编码序列之一。

[0113] 用于表达本公开的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞),其包括与DHFR选择标记(Kaufman和Sharp,1982)一起使用的dhfr-CHO细胞(描述于Urlaub和Chasin,1980)、CHOK1 dhfr+细胞系、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞,例如具有GS Xceed™基因表达系统(Lonza)的GS CHO细胞系。

[0114] 当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养一段足以使抗体在宿主细胞中表达以及任选地将抗体分泌到其中宿主细胞生长的培养基中的时间,来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法在其分泌后从培养基中回收和纯化(Shukla等,2007)。

[0115] 在一个特定实施方案中,本公开的宿主细胞是用表达载体转染的宿主细胞,所述表达载体具有可操作地连接至合适的启动子序列的分别适合于表达mAb1、mAb2、mAb4和mAb5的编码序列。

[0116] 例如,本公开涉及至少包含分别编码mAb1的重链和轻链的SEQ ID NO:8和10的核酸的宿主细胞。

[0117] 然后,可在合适的条件下进一步培养后面的宿主细胞,以表达和生产本公开的分别选自下组的抗体:mAb1、mAb2、mAb4和mAb5。

[0118] 或者,可使用无细胞表达系统生产mAb1、mAb2、mAb4和mAb5中的任何一种。典型地,(Stech等,2017)已经描述了蛋白质或抗体的无细胞表达方法。

[0119] 免疫缀合物

[0120] 在另一方面,本公开的特征在于与治疗部分(诸如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射毒素)缀合的本公开的抗BTN3A抗体或其片段。这种缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如杀死)的任何试剂。实例包括taxon、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、t.秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽醌二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢睾丸激素、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。例如,治疗剂还包括抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶脱卡巴嗪)、消融剂(例如甲氧乙胺、噻吩氯丁酸苄酯、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环硫磷酸胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂、蒽环类药物(例如柔红霉素(旧称道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如放线菌霉素(旧称放线霉素)、博来霉素、光神霉素和蒽霉素(AMC))、单甲基澳瑞他汀E和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0121] 使用本领域可获得的接头技术将细胞毒素缀合至本公开的抗体。已用于使细胞毒素与抗体缀合的接头类型的实例包括但不限于脰、硫醚、酯、二硫键和含肽的接头(诸如缬氨酸-瓜氨酸接头)。例如,可以选择这样的接头,该接头易在低pH下、在溶酶体区室中被裂解,或者易于被蛋白酶(诸如在肿瘤组织中优先被表达的蛋白酶,诸如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、D))裂解。

[0122] 有关细胞毒素的类型、接头和将治疗剂与抗体缀合的方法的进一步讨论,另请参见Panowski等人,2013年的有关抗体药物缀合物的综述。

[0123] 本公开的抗体也可以与放射性同位素缀合以产生细胞毒性放射性药物,也称为放射免疫缀合物。可以与抗体缀合以用于诊断或治疗的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、铟¹¹¹、钇⁹⁰和镭¹⁷⁷。用于制备放射免疫缀合物的方法是本领域已知的。

[0124] 双特异性或多特异性分子

[0125] 在另一方面,本文进一步公开了包含本公开的抗BTN3A抗体的双特异性或多特异性分子。可将抗体衍生化或连接至另一功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体的配体),以产生与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。实际上,抗体可以被衍生化或连接到一个以上的其他功能分子上,以产生与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子。该多特异性分子也被本文所述的术语“双特异性分子”所涵盖。为了产生双特异性分子,可以将本发明的抗体功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,从而产生双特异性分子。

[0126] 因此,本公开包括双特异性分子,该双特异性分子包含至少一个针对BTN3A第一结合特异性(例如mAb1、mAb2、mAb4和mAb5中的任一个的一个抗原结合部分)以及针对第二靶表位的第二结合特异性。

[0127] 另外,对于其中双特异性分子是多特异性的实施方案,除第一和第二靶表位外,该

分子还可以包括第三结合特异性。

[0128] 在一个实施方案中,本文公开的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段作为结合特异性,包括例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Unibody或单链Fv。该抗体也可以是轻链或重链二聚体,或其任何最小片段,诸如Fv或如Ladner等人在美国专利4,946,778中描述的单链构建体。

[0129] 本文公开的双特异性分子中可采用的其他抗体是鼠抗体、嵌合抗体以及人源化单克隆抗体。

[0130] 本公开的双特异性分子可用本领域已知的方法通过将结合特异性的组分缀合来制备。例如,双特异性分子的每种结合特异性部分可以分别产生,然后彼此缀合。当结合特异性部分是蛋白质或肽时,可以使用多种偶联剂或交联剂进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻苯二甲酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(Karpovsky等,1984;Liu等,1985)。其他方法包括Brennan等,1985;Glennie等,1987;Paulus,1985中描述的方法。

[0131] 或者,两种结合特异性都可在相同的载体中编码,并在相同的宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×Fab融合蛋白时,此方法尤其可用。本公开的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子,或者包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。

[0132] 例如,双特异性分子与其特异性靶标的结合可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物活性实验(例如生长抑制和凋亡)或蛋白质印迹实验来确认。这些测定方法中的每一种通常通过采用对目标复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。

[0133] 本公开的抗体还可用于制备人工T细胞受体(也称为嵌合T细胞受体或嵌合抗原受体(CARs))。例如,抗体的可变区可用于形成Fab或scFv,其通过间隔子连接至跨膜结构域(典型地是CD8α的跨膜结构域)和TCR的信号内向结构域(例如CD3ζ),和任选地,刺激信号域(例如来自4-1BB或CD28)并且可以在T细胞的表面产生。该CAR可以用于过继转移疗法中,例如用于治疗增生性疾病。

[0134] 药物组合物

[0135] 在另一方面,本公开提供了含有本文公开的抗体或抗体的组合的组合物,例如药物组合物。例如,选自mAb1、mAb2、mAb4和mAb5或它们的抗原结合部分的一种抗体与药学上可接受的载体一起配制的组合物。该组合物可以包括一种或多种(例如,两种或更多种不同的)抗体的组合,或如上所述的免疫缀合物或双特异性分子。

[0136] 本文公开的药物组合物也可以以联合疗法施用,即与其他药剂联合施用。例如,联合疗法可包括将本公开的抗BTN3A抗体(例如选自下组的一种抗体或它们的抗原结合部分:mAb1、mAb2、mAb4和mAb5)与至少一种抗病毒剂、抗炎药或其他抗增殖药联合。可以在联合疗法中使用的治疗剂的实例在以下关于本公开的抗体的用途部分中更详细地描述。

[0137] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。该载体应适合于静脉、肌肉、皮下、肠胃外、

脊柱或表皮给药(例如,通过注射或输液)。在一个实施方案中,载体应适合于皮下途径或肿瘤内注射。取决于施用途径,可以将活性化合物即抗体、免疫缀合物或双特异性分子包被在材料中,以保护该化合物免受可能使该化合物失活的酸和其他自然条件的作用。

[0138] 无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上可接受的载体的一个实例。其他合适的载体是本领域技术人员公知的(Remington和Gennaro, 1995)。制剂可进一步包括一种或多种赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂、白蛋白等以防止蛋白质在小瓶表面损失。

[0139] 药物组合物的形式、施用途径、剂量和方案自然取决于待治疗的病症、疾病的严重程度、患者的年龄、体重和性别等。

[0140] 本公开的药物组合物可配制成用于局部、口服、肠胃外、鼻内、静脉、肌肉、皮下或眼内施用等。

[0141] 优选地,药物组合物含有对于能够被注射的制剂是药学上可接受的赋形剂。这些可特别是等渗的无菌盐溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠/钾/钙或镁等,或此类盐的混合物),或干燥的,尤其是冷冻干燥的组合物,其视情况而定,通过添加无菌水或生理盐水允许形成可注射液。

[0142] 用于施用的剂量可以根据各种参数的变化,特别是根据所使用的施用方式、相关病理学或所需的治疗持续时间的变化进行调节。

[0143] 为了制备药物组合物,可以将有效量的抗体溶解或分散在药学上可接受的载体或水性介质中。

[0144] 适用于可注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散液;制剂包括麻油、花生油或丙二醇水溶液;以及用于随时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂或冻干剂。在所有情况下,该形式都必须是无菌的,并且必须具有一定的流动性,以达到易于注射的目的。它必须在制造和储存条件下稳定,并且必须保存以防微生物(例如细菌和真菌)的污染。

[0145] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在水中适当地与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)混合而制备。分散液也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物和油中制备。在常规的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0146] 本公开的抗体可以以中性或盐形式配制成组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成),其与无机酸(例如盐酸或磷酸,或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等))形成盐。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物,以及有机碱,例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0147] 载体也可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其合适的混合物,以及植物油。例如,可通过使用包衣(诸如卵磷脂),在分散液的情况下通过维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等,来防止微生物的作用。在许多情况下,最好包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可使可注射组合物的吸收延长。

[0148] 通过将所需量的活性化合物与所需的上述各种其他成分掺入适当的溶剂中,然后过滤灭菌,从而制备无菌注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌赋形剂中来制备分散剂,所述无菌赋形剂含有基础分散介质和上文列举的所需的成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从

其先前的无菌过滤溶液中获得活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0149] 也可考虑制备更浓缩或高度浓缩的溶液以用于直接注射,其中预想使用DMSO作为溶剂,以获得极快的渗透,从而将高浓度的活性剂递送至小的肿瘤区域。

[0150] 在配制后,将以与制剂剂量相容的方式和以治疗有效的量来施用溶液。该制剂易以多种剂型施用,诸如上述可注射溶液的类型,但也可以采用药物释放胶囊等。

[0151] 对于在水溶液中的肠胃外给药,例如,如果必要,应当适当地缓冲溶液,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液尤其适合于静脉、肌内、皮下和腹膜内施用。就此而言,根据本公开,本领域技术人员将知晓可采用的无菌水性介质。例如,一剂可以被溶解在1ml等渗NaCl溶液中,或者被添加到1000ml皮下注射液,或者被注射在建议的输注位点(例如,参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第15版,第1035-1038和1570-1580页)。取决于被治疗对象的状况,剂量的一些变化将必然出现。在任何情况下,负责施用的人员均应确定适合个体受试者的剂量。

[0152] 本公开的抗体可以每剂包含约0.0001-1.0mg,或约0.001-0.1mg,或约0.1-1.0mg或甚至1.0-约10mg的剂量被配制于治疗混合物中。也可以施用多剂量。

[0153] 用于输注或皮下注射抗体的溶液的合适制剂已描述于现有技术中,例如在Cui等人的综述中(Drug Dev Ind Pharm 2017,43(4):519-530)。

[0154] 除了配制用于肠胃外施用(诸如静脉或肌内注射)的化合物外,其他药学上可接受的形式包括(例如口服片剂或其他口服固体、定时释放胶囊,以及当前使用的任何其他形式)。

[0155] 在某些实施方案中,考虑将脂质体和/或纳米颗粒用于将抗体引入宿主细胞。脂质体和/或纳米颗粒的形成和使用是本领域技术人员已知的。

[0156] 纳米胶囊通常可以稳定且可再现的方式截留化合物。为了避免由于细胞内聚合物超载引起的副作用,通常使用能够在体内降解的聚合物来设计这种超细颗粒(尺寸约为0.1 μm)。本公开考虑使用满足这些要求的生物可降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒,且该颗粒可容易地制备。

[0157] 脂质体由分散在水性介质中的磷脂形成,并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。MLV的直径通常为25nm-4 μm 。MLV的超声处理使得形成直径在200-500Å范围内的小单层囊泡(SUVs),其核心中含有水溶液。脂质体的物理特性取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。

[0158] 本公开的抗体的用途和方法

[0159] 本公开的抗体具有体外和体内诊断和治疗用途。例如,可以将这些分子施用于培养中的细胞,例如体外、离体或体内,或在受试者(例如体内)中,以治疗、预防或诊断各种病症。

[0160] 如本文所用,术语“治疗”是指以下的一种或多种:(1)抑制疾病;例如,抑制正在经历或表现出该疾病、病状或病症的病理或症状的个体中的疾病、病状或病症(即,阻止病理和/或症状的进一步发展);(2)改善疾病;例如,改善正在经历或表现出疾病、病状或病症的病理或症状的个体中的疾病、病状或病症(即逆转病理和/或症状),诸如降低疾病的严重程度或减少或减轻疾病的一种或多种症状。特别地,关于肿瘤的治疗,术语“治疗”可以指抑制肿瘤的生长或减小肿瘤的大小。

[0161] 本公开的抗体是抗BTN3A激活抗体,且可以激活V γ 9V δ 2 T细胞的溶细胞功能、细胞因子产生和/或增殖,从而可以用于克服在癌症患者及在慢性感染期间观察到的免疫抑制机制。

[0162] 如本文所用,术语“癌症”,“过度增殖”和“肿瘤性”是指具有自主生长能力的细胞,即以快速增殖的细胞生长为特征的异常状态或病状。过度增殖和赘生性疾病状态可以分类为病理性的,即表征或构成疾病状态;或者可以分类为非病理性的,即与正常状态的偏离但不与疾病状态相关。该术语包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而与组织病理学类型或浸润性阶段无关。

[0163] 术语“癌症”或“肿瘤”包括各种器官系统的恶性肿瘤,诸如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴样、胃肠道和生殖泌尿道的恶性肿瘤,以及腺癌,包括恶性肿瘤(诸如大多数结肠癌、肾脏-细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺非小细胞癌、小肠癌和食道癌)。

[0164] 癌症的实例包括但不限于血液系统恶性肿瘤,诸如B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B-NHL、T-NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、NK细胞淋巴样肿瘤和包括急性髓样白血病的髓样细胞系肿瘤。

[0165] 非血液学癌症的实例包括但不限于结肠癌、乳腺癌、肺癌、脑癌、前列腺癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、骨癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、口腔癌、食道癌、甲状腺癌、肾癌、胃癌、睾丸癌和皮肤癌。

[0166] 慢性感染的实例包括但不限于病毒、细菌、寄生虫或真菌感染,诸如慢性肝炎、肺部感染、下呼吸道感染、支气管炎、流行性感冒、肺炎和性传播疾病。

[0167] 病毒感染的实例包括但不限于肝炎(HAV、HBV、HCV),单纯疱疹(HSV)、带状疱疹、HPV、流感(Flu)、艾滋病和艾滋病相关综合症、水痘(水痘病毒)、普通感冒、巨细胞病毒(CMV)感染、天花(variola)、科罗拉多蜱虫热、登革热、埃博拉出血热、手足口病、拉沙热、麻疹、马尔堡出血热、传染性单核细胞增多症、腮腺炎、诺如病毒、脊髓灰质炎、进行性多灶性白质脑病(PML)、狂犬病、风疹、SARS、病毒性脑炎、病毒性肠胃炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼罗河病和黄热病。细菌感染的实例包括但不限于肺炎、细菌性脑膜炎、霍乱、白喉、结核、炭疽、肉毒中毒、布鲁氏菌病、弯曲菌、斑疹伤寒、淋病、李斯特氏菌病、莱姆病、风湿热、百日咳(Whooping Cough)、鼠疫、沙门氏菌病、猩红热、志贺氏菌病、梅毒、破伤风、沙眼、土拉菌病、伤寒热和尿路感染。实例还包括由伯氏柯氏杆菌、流产布鲁氏菌、鞭毛螺旋体、结核分枝杆菌和卡尼分枝杆菌引起的细菌感染。

[0168] 寄生虫感染的实例包括但不限于疟疾、利什曼病、锥虫病、恰加斯病、隐孢子虫病、筋膜炎、丝虫病、阿米巴感染、贾第鞭毛虫病、蛲虫感染、血吸虫病、绦虫病、弓形虫病、毛虫病和锥虫病。真菌感染的例子包括但不限于念珠菌病、曲霉病、球孢子菌病、隐球菌病、组织胞浆菌病和足癣。

[0169] 因此,本公开涉及用于在有此需要的受试者中治疗上述公开的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的上文公开的抗BTN3A抗体,典型地为mAb1、mAb2、mAb4或mAb5之一。

[0170] 在某些实施方案中,所述受试者选自具有表达BTN3A的肿瘤的患者。

[0171] 如上公开的用途的抗体可以作为唯一的活性成分,或例如作为佐剂连同或联合其他药物(如细胞因子、抗病毒、抗炎剂或细胞毒性、抗增殖、化疗或抗肿瘤剂、细胞治疗产品

(例如 γ δ T 细胞组合物)施用,以用于治疗或预防上述疾病。

[0172] 例如,如上公开的用途的抗体可以与细胞疗法,特别是 γ δ T 细胞疗法、化疗、抗肿瘤剂或免疫治疗剂联合使用。

[0173] 如本文所用,术语“细胞疗法”是指包括向需要其的受试者体内施用至少治疗有效量的细胞组合物的疗法。施用于患者的细胞可以是同种异体的或自体的。术语“ γ δ T 细胞疗法”是指其中细胞组合物包括作为活性成分的 γ δ T 细胞,特别是 V γ 9/V δ 2T 细胞的细胞疗法。

[0174] 细胞治疗产品是指出于治疗目的而施用于所述患者的细胞组合物。所述细胞治疗产品包括治疗有效剂量的细胞和任选的其他赋形剂、佐剂或其他药学上可接受的载体。

[0175] 合适的抗肿瘤剂可包括但不限于烷基化剂(诸如环磷酰胺、甲氯胺酮、苯丁酸氮芥、美法仑、亚硝基脲、替莫唑胺)、蒽环类药物(诸如柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、戊柔比星)、紫杉烷类(诸如紫杉醇、多西他赛)、埃博霉素、拓扑异构酶 I 的抑制剂(诸如伊立替康或托泊替康)、拓扑异构酶 II 的抑制剂(诸如依托泊苷、替尼泊苷或他氟泊苷)、核苷酸类似物和前体类似物(诸如阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲氨蝶呤或噻鸟嘌呤)、肽类抗生素(诸如卡铂、顺铂和奥沙利铂)、类维生素 A(诸如维甲酸、阿利维 A 酸、贝沙罗汀)、长春花生物碱和衍生物(诸如长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)、靶向疗法,诸如激酶抑制剂(诸如依鲁替尼、依达拉西布、厄洛替尼、吉非替尼、伊马替尼、维拉非尼、维莫非尼)、蛋白酶体抑制剂(诸如硼替佐米、卡非佐米)、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(诸如伏立诺他或罗米地辛)。

[0176] 免疫治疗剂的实例包括但不限于磷酸抗原(例如唑来膦酸或其他双膦酸盐)、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 BTLA 抗体、抗 CTLA-4 抗体和细胞因子(诸如白介素 2 (IL-2) (Choudhry H 等, 2018, Biomed Res Int. 2018 年 5 月 6 日)、白介素 15 (IL-15) (Patidar M 等, Cytokine Growth Factor Rev. 2016 年 10 月; 31: 49-59)、白介素 21 (IL-21) (Caccamo N. 等, PLoS One. 2012; 7 (7) : e41940) 或白介素 33 (IL-33) (Duault C 等, J Immunol. 2016 年 1 月 1 日; 196 (1) : 493-502)), 其重组形式及其衍生物, 或任何能够诱导淋巴细胞活性(例如增殖或细胞因子产生或代谢变化)的细胞因子。术语衍生物用于可依赖于 PEG 化(例如与聚乙二醇 (PEG) 链缀合)的任何细胞因子修饰, 诸如氨基酸缺失、取代或插入的突变, 或与增强剂的结合(例如与 IgG1 Fc 融合的 IL15/IL15Ra 复合物, 其中 IL-15 另外发生突变 (asn72asp), 进一步增强了生物活性, 使该复合物成为 IL-2 和 IL-15R β γ 超级激动剂 (Rhode PR 等, Cancer Immunol Res. 2016; 4 (1) : 49-60)) (Barroso-Sousa R 等, Curr Oncol Rep. 2018 年 11 月 15 日; 21 (1) : 1)。

[0177] 术语“IL-2”具有其一般含义, 并且是指人白介素-2。IL-2 是人体自然免疫反应的一部分。IL-2 主要通过 IL-2 受体结合来调节淋巴细胞活性。

[0178] 术语“IL-15”具有其一般含义, 并且是指人白介素-15。与 IL-2 一样, IL-15 结合并通过由 IL-2/IL-15 受体 β 链 (CD122) 和通用 γ 链 (γ -C, CD132) 组成的复合物发出信号。IL-15 调节 T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞的活化和增殖。

[0179] 术语“IL-21”具有其一般含义, 并且是指人白介素-21。IL-21 已被归因于多效性, 包括但不限于增强 NK 细胞和 CD8+T 细胞的细胞毒性、调节浆细胞分化和抑制 Treg 细胞。

[0180] 术语“IL-33”具有其一般含义, 并且是指人白介素 33。被认为是在组织受到压力或

破坏时释放的警报蛋白的IL-33是IL-1家族的成员,并与ST2受体结合。已知IL-33是T_H1免疫细胞、自然杀伤(NK)细胞、iNKT细胞和CD8 T淋巴细胞的有效刺激剂。

[0181] 术语“PD-1”在本领域中具有其一般含义,并且是指程序性死亡-1受体。术语“PD-1”还指I型跨膜蛋白,其属于CD28-B7信号转导受体家族的成员,该家族包括CD28、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4)、诱导型共刺激物 (ICOS) 以及B和T淋巴细胞减毒剂 (BTLA) (Greenwald RJ等,2005;Riley JL等,2005)。

[0182] 术语“BTLA”在本领域中具有其一般含义,并且是指B和T淋巴细胞减毒剂。术语“BTLA”也指CD272,它是CD28-B7信号转导受体家族的成员,该家族包括CD28、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4)、诱导型共刺激物 (ICOS) 和程序性死亡-1受体 (PD-1) (Greenwald RJ等;2005,Riley JL等,2005)。

[0183] 术语“抗PD-1抗体”或“抗PD-L1”具有本领域的一般含义,并且是指分别对PD-1或PD-L1具有结合亲和力且对PD-1具有拮抗活性的抗体,即其抑制与PD-1有关的信号转导级联并抑制PD-1配体结合 (PD-L1;PD-L2)。相比于其与受体的CD28-B7信号转导家族的其他亚型或同工型 (CD28;CTLA-4;ICOS;BTLA) 的相互作用,此类抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体分别优先地以更大的亲和力和效力来灭活PD-1。用于确定化合物是否为PD-1拮抗剂的测试和测定法是本领域技术人员公知的,例如描述于Greenwald等 (2005)、Riley等 (2005) 中。

[0184] 此类抗PD1或抗PDL1抗体的实例包括但不限于尼古拉单抗、派姆单抗、奥维单抗、杜鲁伐单抗、西米普利单抗或阿妥珠单抗。

[0185] 此类抗CTLA4抗体的实例包括但不限于伊匹木单抗。

[0186] 术语“抗BTLA抗体”在本领域中具有其一般含义,并且是指对BTLA具有结合亲和力和拮抗活性的抗体,即其可抑制与BTLA有关的信号转导级联反应。用于确定化合物是否为BTLA拮抗剂的测试和测定法是本领域技术人员公知的,例如描述于Greenwald等 (2005)、Riley等 (2005) 中。

[0187] 在一些实施方案中,抗BTLA抗体选自描述于国际专利申请W02010/106051;W02011/014438和W02017/144668中的那些。

[0188] 在一些实施方案中,抗BTLA抗体是BTLA抗体 (BTLA8.2),其可从W02010/106051中公开的,以CNCM保藏号I-4123保藏的杂交瘤获得。

[0189] 在一些实施方案中,抗BTLA抗体是W02011/014438中公开的4C7 mAb。

[0190] 在一些实施方案中,抗BTLA抗体是W02017/144668中公开的单克隆抗体629.3mAb或其人源化形式或其变体。

[0191] 根据前述内容,本公开在又另一方面提供:

[0192] 如上所定义的方法,其包括共同施用 (如伴随使用或顺次使用) 治疗有效量的本公开的抗BTN3A抗体,和至少一种第二药物,所述第二药物是抗病毒或抗增殖剂或免疫治疗剂 (诸如抗PD-1、抗PD-L1抗体) 或细胞因子 (例如IL-2或IL-15) 或细胞治疗产品 (诸如 γ δ T细胞),例如如上文所述。

[0193] 在一个实施方案中,本公开的抗体可用于检测可溶性BTN3A的水平或表达BTN3A的细胞的水平。例如,可通过在允许抗体和BTN3A形成复合物 (如在细胞表面或可溶性BTN3A,如血液样本中表达) 的条件下,将样品 (诸如体外样品) 和对照样品与抗BTN3A抗体接触来实现。检测并比较样品和对照中抗体与BTN3A之间形成的任何复合物。例如,可用本公开的组

合物来进行本领域公知的标准检测方法(诸如ELISA和流式细胞仪)进行测定。

[0194] 因此,一方面,本公开进一步提供了用于检测样品中BTN3A(例如人BTN3A抗原)的存在或测量BTN3A的量的方法,其包括在允许抗体或其部分与BTN3A形成复合物的条件下,使样品和对照样品与本公开的抗体或蛋白质或特异性结合BTN3A的抗原结合区接触。然后,检测复合物的形成,其中,与对照样品比较,样品中复合物形成的差异指示样品中BTN3A的存在。

[0195] 试剂盒也包括在本公开的范围,所述试剂盒由本文公开的组合物(例如人源化抗体、缀合的抗体和多特异性分子)和使用说明书组成。试剂盒可进一步含有至少一种其他试剂,或一种或多种其他抗体或蛋白质。试剂盒典型地包括标明试剂盒内容物预期用途的标签。术语标签包括试剂盒上、随试剂盒提供或随试剂盒附带的任何文字或记录材料。如上定义,试剂盒可进一步包括用于诊断患者是否属于对抗BTN3A抗体治疗有反应的人群的工具。

[0196] 另一种治疗方法是基于将本公开的人源化抗体作为选择性扩增和/或活化从人类受试者样品分离的V γ 9V δ 2T细胞的试剂的用途。

[0197] 因此,本公开涉及一种用于治疗有此需要的受试者的方法,包括:

[0198] (a) 从受试者的血液样本中分离出包含V γ 9V δ 2T细胞的血细胞,例如PBMC,

[0199] (b) 在mAb1、2、4和5中的任何一种,以及任选地,其他肿瘤或辅助细胞的存在下,体外扩增V γ 9V δ 2T细胞,

[0200] (c) 收集扩增的V γ 9V δ 2T细胞,

[0201] (d) 任选地,配制扩增的V γ 9V δ 2T细胞并向受试者施用治疗有效量的所述V γ 9V δ 2T细胞。

[0202] 本公开进一步涉及本文公开的人源化抗体(诸如mAb1、mAb2、mAb4或mAb5)作为选择性扩增嵌合抗原受体(CAR) V γ 9V δ 2T细胞的试剂的用途。CAR γ δ T细胞及其在过继性T细胞癌症免疫疗法中的应用描述于例如Mirzaei等人中(Cancer Lett 2016,380(2):413-423)。

[0203] 本公开还涉及抗BTN3A抗体,其在有此需要的(通常患有癌症的)受试者体内用作 γ δ T细胞疗法中的肿瘤细胞的增强剂。

[0204] 如本文所用,术语 γ δ T细胞疗法是指包括向有此需要的受试者施用至少有效量的 γ δ T细胞的疗法。这些 γ δ T细胞可以是同种异体的或自体的。在特定实施方案中,可以通过缺失或敲除或插入或敲入特定基因来对 γ δ T细胞进行基因工程化改造。在特定实施方案中,所述 γ δ T细胞包括表达嵌合抗原受体的 γ δ T细胞。 γ δ T细胞可能已经被离体扩增和/或纯化。或者, γ δ T细胞也可以包含在含其他血细胞,例如免疫系统的其他细胞的细胞组合物中。有关 γ δ T细胞疗法的参考资料,请参见Pauza CD.等,Front Immunol.2018年6月8日;9:1305.doi:10.3389,Saudemont A.等,Front Immunol.2018年2月5日;9:153.doi:10.3389。

[0205] 实际上,不受任何特定理论的束缚,本公开的抗BTN3A抗体的提议的作用方式是它们与在肿瘤细胞表面表达的BTN3A的结合触发构象变化,使其能够在V γ 9V δ 2T细胞上向其反受体发出信号。

[0206] 因此,本公开涉及一种治疗患有癌症(例如血液恶性肿瘤,特别是白血病,诸如急性髓样白血病,并具有肿瘤细胞,例如血液肿瘤细胞)的受试者的方法,所述方法包括:

[0207] (i) 在所述受试者中施用有效量的本文公开的抗BTN3A抗体,典型地是mAb1、mAb2、mAb4或mAb5,并且

[0208] (ii) 在所述受试者中施用有效量的 γ δ T细胞组合物,

[0209] 其中所述有效量的抗BTN3A抗体具有增强由所述 γ δ T细胞组合物介导的针对所述肿瘤细胞的抗肿瘤细胞溶解的能力。

[0210] 本公开进一步涉及用于治疗患有实体肿瘤细胞(如卵巢癌细胞)的癌症的受试者的方法,所述方法包括:

[0211] (i) 在所述受试者中施用有效量的本文公开的抗BTN3A抗体,典型地是mAb1、mAb2、mAb4或mAb5,并且

[0212] (ii) 在所述受试者中施用有效量的 γ δ T细胞组合物,

[0213] 其中所述有效量的抗BTN3A抗体具有增强由所述 γ δ T细胞组合物介导的针对所述肿瘤细胞的抗肿瘤细胞溶解的能力。

[0214] 本公开还涉及用于治疗有此需要的受试者的方法,所述方法包括CAR T细胞(例如CAR γ δ T细胞)和本文公开的人源化抗体(诸如mAb1、mAb2、mAb4或mAb5)的联合(同时或顺次)施用。

[0215] 现在通过以下实施例进一步说明已经充分描述的本发明,这些实施例仅是说明性的,并不意味着进一步限制。

附图说明

[0216] 图1:上图.从PBMC中扩增出的人V γ 9V δ 2T细胞与Daudi细胞系(Burkitt淋巴瘤)以E:T 1:1的比例与指定浓度的mAb1(或相应的同型对照)共培养4小时。细胞用CD107a和CD107b抗体染色,阳性表达的细胞基于未刺激的对照组。实验是由3名健康捐赠者完成的。中图.将Daudi细胞与指定浓度的mAb1(或相应的同型对照)在37°C下预孵育1小时。大量洗涤后,将经mAb脉冲处理的Daudi细胞与扩增的人V γ 9V δ 2T细胞在37°C下共培养4小时,然后测量Caspase 3/7对Daudi的活性。对于上图和中图,使用GraphPad Prism软件的Sigmoidal 4PL方程获得曲线拟合。下图.先前在(A)和(B)中所述的相同方法评估mAb1(和相应的同型对照)在其他肿瘤细胞系(L-IPC:胰管腺癌,HT29:大肠腺癌,A549:肺癌)与Daudi细胞系上10 μ g/mL下使用的功效的比较。

[0217] 图2:mAb1介导BTN3A表达靶细胞被V γ 9V δ 2T细胞杀死。

[0218] A. 在浓度递增的mAb1(或相关同型对照hIgG1) +/- rHuIL-2 (20IU/ml) 存在下,将10,000个HL60-WT或BTN3AKO细胞(急性髓样白血病)与体外扩增的V γ 9V δ 2 T细胞(比例E:T 1:1)共培养24小时。使用检测ATP水平的生物荧光测定法测量细胞活力。

[0219] B. 在浓度递增的mAb1(或相关同型对照hIgG1) +/- rHuIL-2 (20IU/ml) 存在下,将10,000个HL60-WT细胞与体外扩增的V γ 9V δ 2 T细胞(比例E:T 1:1)共培养4天。每天测量细胞活力。

[0220] C. 在浓度递增的mAb1 +/- rHuIL-2 (20IU/ml) 存在下,将10,000个HL60-WT细胞与从人PBMC中分离的新鲜V γ 9V δ 2 T细胞共培养4天(比例E:T 1:1和1:5)。每天测量细胞活力。*标记信号。

[0221] 图3:在不同浓度的mAb1存在下,将10,000个来自不同组织来源的肿瘤细胞与体外

扩增的V γ 9V δ 2 T细胞 (比例E:T 1:1) 共培养24小时。使用检测ATP水平的生物荧光测定法测量细胞活力。显示了生物荧光值。4条带从左至右表示: (1) 无mAb, (2) mAb1 0.1 μ g/ml, (3) mAb1 1 μ g/ml, (4) mAb1 10 μ g/ml

[0222] 图4:mAb1促进食蟹猴V γ 9V δ 2 T细胞的扩增和活化

[0223] A. 用红细胞裂解缓冲液处理来自3只动物的食蟹猴全血。大量洗涤后, 将细胞以1.5M/mL接种在含有200IU/mL rHuIL-2和mAb1 (10 μ g/mL) 的培养基中。在第0、3、6、8和10天使用特异性抗体通过流式细胞仪评估V γ 9+T细胞的百分比。该图显示了活细胞中V γ 9+T细胞百分比的动力学。每条曲线代表单个动物。

[0224] B. 扩增10天后, 在培养基、mAb1或同型对照 (10 μ g/mL) 存在下, 将每只动物的细胞与用作靶细胞的Daudi、K562或Raji (比例E:T 1:1) 共培养4小时, 并通过流式细胞仪分析细胞脱粒 (CD107a/b)。

[0225] 图5: 在ICT01给药后指定时间采集的食蟹猴血样用特异性抗体混合物染色以定量T细胞亚群 (CD4、CD8、V γ 9T细胞、调节性T细胞)、B细胞、单核细胞、NK细胞、mDC、pDC和粒细胞, 并通过流式细胞仪进行分析。上图显示了单剂量动物的CD3+T细胞中V γ 9 δ 2T细胞的百分比。下图显示了多剂量动物的CD3+T细胞中V γ 9 δ 2T细胞的%。数据表示为每个采样时机和组的平均值 $\pm$ SD。垂直虚线表示ICT01给药时间。

实施例

[0226] 人源化变体的选择

[0227] 1. 人源化策略的描述

[0228] a. 复合人抗体TM可变区序列的设计

[0229] 使用Swiss PDB生成了鼠7.2和20.1抗体V区的结构模型, 并进行了分析, 以鉴定V区中重要的“限制性”氨基酸, 这些氨基酸可能对抗体的结合性能必不可少。CDR中包含的大多数残基 (同时使用Kabat和Chothia定义) 以及许多骨架残基被认为非常重要。通过以上分析, 已经创建了7.2和20.1抗体的复合人序列。

[0230] b. 避免CD4+T细胞表位

[0231] 基于结构分析, 选择了可用于创建7.2和20.1人源化变体的大量初步序列片段, 并使用iTopeTM技术进行了分析, 用于对结合人MHC II类等位基因的肽进行计算机分析 (Perry等, 2008), 并使用TCEDTM分析已知抗体序列相关的T细胞表位 (Bryson等, 2010)。丢弃那些被鉴定为人MHC II类的重要非人种系结合物或对命中TCEDTM得分很高的序列片段。这导致一系列片段的减少, 并且如上所述再次分析它们的组合以确保片段之间的连接不含有潜在的T细胞表位。将选择的序列片段组装成完整的、经预测没有明显的T细胞表位的V区序列。然后, 选择几个重链和轻链序列进行mAb 7.2和20.1在哺乳动物细胞中的基因合成和表达。

[0232] 2. 人源化变体的产生和初步表征

[0233] a. 人源化变体质粒的构建

[0234] 合成具有侧翼限制性酶切位点的7.2和20.1人源化变体, 以克隆到人IgG4 (S241P、L248E) 重链和 κ 轻链的表达载体系统中。通过测序确认所有构建体。

[0235] b. 抗体的表达

[0236] 使用MaxCyteSTX[®]电穿孔系统 (MaxCyte Inc., Gaithersburg, USA) 从相应的无

内毒素DNA,将嵌合的7.2和20.1(VH0/V κ 0),两个对照组合(VH0/V κ 1,VH1/V κ 0)和人源化重链和轻链组合瞬时转染到FreeStyle™CHO-S细胞(ThermoFisher,Loughborough,UK)中。使用OC-400处理组件对每种抗体进行转染。回收细胞后,将细胞稀释到含有8mM L-谷氨酰胺(ThermoFisher,Loughborough,UK)和1 $\times$ 黄嘌呤-胸苷(ThermoFisher,Loughborough,UK)的CD Opti-CHO培养基(ThermoFisher,Loughborough,UK)中,稀释至3 $\times 10^6$ 个/mL。转染后24小时,将培养温度降低至32℃,并添加1mM丁酸钠(Sigma,Dorset,UK)。每天添加(起始体积的)3.6%的养料(2.5%CHO CD高效养料A(ThermoFisher,Loughborough,UK)、0.5%酵母粉(BD Biosciences,Oxford,UK)、0.25mM谷氨酰胺(ThermoFisher,Loughborough,UK)和2g/L葡萄糖(Sigma,Dorset,UK))来给料培养基。通过IgG ELISA监测IgG上清液的滴度,并在收获上清液之前将转染培养长达14天。

[0237] c. 亲和力初步测量:结合BTN3A的人源化变体的单周期动力学分析

[0238] 为评估所有7.2和20.1复合人抗体™变体的结合以及选择对BTN3A具有最高亲和力的抗体,使用载有Biacore T200评估软件V2.0.1(Uppsala,Sweden)的Biacore T200(serial no.1909913)对来自转染的细胞培养的上清液进行了单周期动力学分析。

[0239] 基于从通过ELISA滴定的上清液中获得的浓度,将抗体在2%BSA/PBS中稀释至最终浓度为2 μ g/ml。在每个周期开始时,将抗体加载至Protein A芯片(GE Healthcare,Little Chalfont,UK)的Fc2、Fc3和Fc4上。以10 μ l/min的流速捕获IgG,以获得固定化水平(RL)为约146.5RU,RMax的理论值为约50RU。然后,使表面稳定。在60 μ l/min的流速下使用BTN3A1-His作为分析物(Sino Biological Cat.No.15973-H08H)以最大程度地降低任何潜在的传质影响,并用HBS-P+(GE Healthcare,Little Chalfont,UK)作为运行缓冲液,来获得单周期动力学数据传质。用嵌合抗体进行多次重复以检查表面和分析物在动力学周期中的稳定性周期。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自对照通道Fc1(无抗体)的信号,以校正非特异性结合至对照表面的差异。使用1.56nM-25nM BTN3A1的三点四倍稀释范围,每种浓度之间无再生。监测三次注射浓度递增的BTN3A1的结合阶段,每次240秒,并在最后一次注射BTN3A1后,单解离阶段测量2000秒。使用2次注射pH 1.5的10mM甘氨酸-HCl进行蛋白A表面再生,然后稳定240秒。

[0240] 减去来自每个抗体空白运行(无CD277)的信号,以校正表面稳定性的差异。单周期动力学表明,所有人源化变体均与BTN3A结合。

[0241] d. 抗体的纯化

[0242] 根据Biacore计算的亲和力,以及iTope™计分和每个人源化变体的人源百分比,选择具有最佳亲和力和最佳iTope™得分的7.2和20.1人源化变体进行进一步分析。

[0243] 将所选的人源化变体及其嵌合形式和最保守的人源化变体(VH1/V κ 1)经历纯化,以进行进一步分析测试。从Protein A Sepharose柱上的细胞培养上清液,然后用10mM乙酸钠、100mM NaCl(pH 5.5,作为流动相)和最终制剂缓冲液,通过尺寸排阻色谱法(SEC)(GE Healthcare,Little Chalfont,UK)纯化抗体。基于预测的氨基酸序列,使用消光系数(Ec(0.1%))在OD_{280nm}对样品进行定量。

[0244] 使用SDS-PAGE,通过在凝胶上加载2 μ g的每种抗体并观察与典型抗体谱相对应的条带来分析抗体。

[0245] e. 结合性能的验证:人源化和嵌合7.2和20.1mAb之间的竞争ELISA分析

[0246] 测试了在与相应的鼠抗体竞争同时,纯化的变体与重组BTN3A1-His (Sino Biological cat.no.15973-H08H) 的结合。在每块板上测试嵌合(VH0/Vκ0) 和无关的人IgG4 (S241P、L248E) 进行比较。

[0247] 将BTN3A1在1xPBS中稀释至0.5μg/ml,然后在96孔ELISA板上,100μl/孔加载,4℃下过夜。第二天,将板用1×PBS/0.05% Tween (PBS-T) 洗涤3次,并在室温下用200μl 2%的奶/PBS封闭1小时。在稀释的96孔板上,等体积加入固定浓度的鼠抗体7.2或20.1(最终浓度0.15μg/ml)至四倍滴度的系列测试抗体(从稀释于封闭缓冲液的80μg/ml开始(40μg/ml最终浓度))中。用PBS-T将Nunc ELISA板洗涤3次后,将100μl鼠抗体/测试抗体混合物加到ELISA板上。在室温下孵育1小时后,将板用PBS-T清洗3次,并在室温下,施加100μl在封闭缓冲液中以1:1000稀释的抗小鼠Fc HRP标记的二抗(Sigma,Dorset,UK)1小时,以检测结合的鼠抗体。为了显色,将板用PBS-T洗涤3次,然后添加100μl TMB底物,并在室温下孵育5分钟。用100μl 3.0M盐酸终止反应,并立即使用Dynex读板器在450nm处读取吸光度。

[0248] 计算每个变体的IC₅₀值,并通过将人源化变体的IC₅₀除以在同一板上测定的嵌合抗体的IC₅₀来计算相对IC₅₀值。

[0249] 3.人源化候选物的选择

[0250] a.多周期动力学分析

[0251] 基于竞争ELISA和热稳定性评估获得的数据,使用运行Biacore T200评估软件V2.0.1(Uppsala,Sweden)的Biacore T200(serial no.1909913)仪器,对大多数人源化7.2和20.1变体以及VH0/Vκ0嵌合抗体进行了多周期动力学分析。

[0252] 将纯化的抗体在2%BSA/PBS中稀释至2μg/ml的浓度。在每个周期开始时,每种抗体均以约146.5RU的密度(RL)(RMax的理论值约50RU)被捕获在Protein A上。捕获后,使表面稳定,然后注射BTN3A1抗原(Sino Biological cat.no.15973-H08H)。将BTN3A1在0.1%BSA/HBS-P+(运行缓冲液)中以25-0.78nM的两倍稀释度滴定。监测结合阶段400秒,解离阶段35分钟(2100秒)。使用50μl/min的流速获得动力学数据,以最小化任何潜在的传质影响。在每个周期结束时,注射两次10mM甘氨酸-HCL(pH 1.5)进行Protein A表面的再生。对每种测试的抗体进行两次空白(无BTN3A1)和重复的单一浓度分析物,以检查表面和分析物在动力学周期内的稳定性。从Fc2、Fc3和Fc4的信号减去对照通道Fc1的信号,以校正非特异性结合至对照表面的差异。此外,每个Fc均减去空白运行,以校正任何不依赖抗原的信号变化,诸如漂移(drift)。在全局RMax参数且无大量信号(恒定RI=0RU)下,使用一对一结合数学模型拟合传感图(sensorgram)。

[0253] b.通过流式细胞仪对人PBMC进行结合测试

[0254] 7.2和20.1人源化变体的特征在于它们与从健康供体的血液中分离得到的人PBMC的结合。使用Lymphoprep(Axis-shield,Dundee,UK)密度离心机从血沉棕黄层中分离PBMC。然后,将PBMC冷冻并储存在-80℃或液氮中待用。

[0255] 将100μl细胞以1×10⁶个细胞/ml的浓度转移至干净的U形底部的96孔板的每个孔中,然后将板离心并丢弃上清液。

[0256] 在PBS2mM EDTA中制备0.001μg/ml-150μg/ml抗体的一系列稀释液。将人PBMC重悬于50μl制备的稀释的测试抗体滴度系列。

[0257] 在黑暗中于4℃孵育30分钟后,将板离心并用150μl/孔的PBS 2mM EDTA洗涤两次,

然后将孔重悬于50 μ l的由稀释1/100的山羊抗人抗体(PE标记)和在PBS2mM EDTA中稀释1/500的活/死纯IR组成的混合物中。

[0258] 在黑暗中于4℃孵育15分钟后,将板离心并用150 μ l/孔PBS2mM EDTA洗涤一次,然后将孔重悬于200 μ l PBS 2mM EDTA中。在BD LSR Fortessa细胞计数器上分析细胞。使用FlowJo软件(版本10,FlowJo,LLC,Ashland,USA)分析数据(数据未显示)。

[0259] 对食蟹猴PBMC和Daudi Burkitt淋巴瘤细胞系进行相同的操作。

[0260] c. 体外功能功效: $\gamma\delta$ -T细胞脱粒测定

[0261] 该测定包括测量7.2和20.1人源化变体及其嵌合形式在 $\gamma\delta$ -T细胞脱粒中,对Daudi Burkitt淋巴瘤细胞系的活化或抑制作用(Harley等,2012)。通过将来自健康供体的PBMC与唑来膦酸(1 μ M)和IL2(200Ui/ml)培养11-13天,来扩增 $\gamma\delta$ -T细胞。IL5在第5天、第8天和之后每2天添加一次。在培养开始时确定 $\gamma\delta$ -T细胞的百分比,并在培养过程中通过流式细胞仪评估直至百分比达到至少80%。然后,将冷冻的或新鲜的 $\gamma\delta$ -T细胞用于对Daudi细胞系(E:T比例为1:1)的脱粒试验,其中在10 μ g/ml的7.2和20.1人源化变体及其嵌合形式的存在下,将细胞在37℃共培养4小时。PMA(20ng/ml)和碘霉素(1 μ g/ml)的活化可作为 $\gamma\delta$ -T细胞脱粒的阳性对照,而单独的培养基则可作为阴性对照。共孵育4小时后,通过流式细胞仪分析细胞,以评估对于CD107a(LAMP-1,溶酶体相关膜蛋白-1)+CD107b(LAMP-2)阳性的 $\gamma\delta$ -T细胞的百分比。在活化诱导的颗粒胞外分泌作用后,CD107被动员到细胞表面,因此表面CD107的测量是用于识别最近脱粒的溶细胞性T细胞的敏感标志物。在被测候选物中未显示任何显著的变化结果,而在脱粒测定中显示出与嵌合7.2或20.1抗体相似的活化效果。

[0262] 使用从患者身上分离出的AML母细胞代替Daudi细胞作为靶细胞,进行了相同的实验。

[0263] d. 热稳定性分析

[0264] 为了评估选择的7.2和20.1复合人抗体TM变体的热稳定性,使用基于荧光的热位移测定法确定了解链温度(50%的蛋白质结构域解折叠的温度)。

[0265] 将所有纯化的人源化抗体和嵌合(VH0/V κ 0)抗体在含有SYPRO[®]Orange(ThermoFisher,Loughborough,UK)的制剂缓冲液(10mM乙酸钠,100mM NaCl,pH 5.5)中稀释1000倍至终浓度0.1mg/ml,并在StepOnePlus real-time PCR系统(ThermoFisher,Loughborough,UK)上经历25℃-99℃的温度梯度加载56分钟。将10mM乙酸钠、100mM NaCl(pH 5.5)用作阴性对照。使用蛋白质热稳定性软件(version 1.2)分析了解链曲线。

[0266] e. 人源化候选物的选择

[0267] 基于上述实验获得的所有结果,从35个变体(对于7.2,产生了15个人源化变体;对于20.1,产生了20个人源化变体)中选择了3个变体用于进一步表征:7.2(VH2/V κ 1)、7.2(VH2/V κ 2)和20.1(VH3/V κ 1)。

[0268] 上述关于mAb 7.2和20.1的不同实验结果报道于表4中,而关于3种变体及其嵌合形式报道于表5中。

[0269] 表4:选择的人源化候选物与鼠亲本抗体具有相同的效力

[0270]	候选物	7.2 VH2/Vk1	7.2 VH2/Vk2	7.2 VH0/Vk0	20.1 VH3/Vk1	20.1 VH0/Vk0
	Biacore 亲和力 多周期动力学 ($\times 10^{-10}$) (K_D , M)	2.53	2.43	1.76	3.19	2.34
	在人 PBMC 上 结合 (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	3.86	5.94	3.6	3.38	3.02
	与食蟹猴 PBMC 结合 (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	12.0	9.85	7.75	5.74	4.06
	与淋巴瘤结合 (Daudi) (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	2.02	2.01	1.44	1.59	1.19
	功能测定 (Daudi) (基于 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞, EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
	功能测定(AML 敏感性) (基于 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞, EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	0.21	0.19	0.12	0.15	0.05
[0271]	功能测定(AML 抗性) (基于 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞, EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	0.73	0.64	0.42	0.32	0.18

[0272] 表5:与鼠候选物相比,选择的具有VH2和Vk1或Vk2的人源化候选物mAb7.2具有更高的热稳定性

[0273]	候选物	7.2 VH2/Vk1	7.2 VH2/Vk2	7.2 VH0/Vk0
	热稳定性 (T_m 2 平均值) ($^{\circ}\text{C}$)	77.1	77.3	72.5

[0274] 人源化过程导致具有预期的降低的免疫原性的多个7.2和20.1变体产生。

[0275] 在功能测定中,在亲和力、结合力和功效方面,这三个变体(7.2VH2/VK1、7.2VH2/VK2和20.1VH3/VK1)中选择的一组表现出与它们的嵌合形式等同的性能:在变体序列中进行的降低免疫原性的修饰并未改变抗体的功能。

[0276] 令人惊讶地,与嵌合抗体相比,所选择的人源化变体7.2VH2/VK1、7.2VH2/VK2的热稳定性得到了改进,并且这种改进的热稳定性在该人源化过程中是难以预期的。

[0277] 抗体恒定区:沉默Fc片段的比较

[0278] 测试了几个Fc部分以沉默或降低抗体的效应子功能。使用Biacore评估这些Fc片段与不同Fc γ 受体的结合;通过ELISA测定评估它们在C1q复合物上的结合。

[0279] 1.使用Biacore评估工程化的Fc部分与不同Fc γ 受体的结合

[0280] 使用纯化的抗体和单周期Biacore分析确定嵌合抗体20.1的不同的同型(IgG1、IgG1[N314A]、IgG1[L247F,L248E P350S]、IgG2、IgG4[S241P]和IgG4[S241P L248E])与不同Fc γ 受体结合的能力。人Fc受体、Fc γ RI、Fc γ RIIA(Arg167多态性)和IIB以及Fc γ RIIIA(Phe176多态性)和IIIB获自Sino Biological。

[0281] Fc γ 受体在HBS-P+(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)中稀释至0.5或1.0 μ g/ml的终浓度。在每个周期开始时,将Fc γ 受体加载至抗His CM5芯片(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)的Fc2、Fc3和Fc4上。以5 μ l/min的流速捕获Fc γ 受体,以取决于Fc γ 受体的分子量,获得30-180RU的固定水平。然后,使表面稳定。使用嵌合抗体作为分析物以30 μ l/min的流速获得单周期动力学数据,以最小化任何潜在的传质影响。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自对照通道Fc1(无抗体)的信号,以校正非特异性结合至对照表面的差异。对于每种嵌合抗体,使用五点三倍的稀释范围,取决于预期的亲和力差异,每个单独的Fc γ 受体的浓度各不相同。减去来自每个空白运行(无抗体)的信号以校正表面稳定性的差异。对浓度不断增加的嵌合抗体的五次注射的每一次,检测其结合阶段25-180秒(取决于Fc γ 受体配体),并且在最后一次抗体注入后,测定单一解离阶段25-300秒。使用两次注射10mM甘氨酸-HCl(pH 1.5),每次以30 μ l/min持续15秒,然后稳定180秒来对抗His表面进行再生。

[0282] 在可能的情况下,使用标准的1:1分析模型确定单周期动力学常数。对于强相互作用,通常更适合通过动力学实验确定亲和力。但是,对于几种Fc γ 受体,相互作用非常弱,并且在这种情况下,使用稳态亲和力分析(特别适合于测量弱至中等相互作用)分析数据。获得了Fc γ 受体与嵌合抗体相互作用的传感图(数据未显示)。

[0283] 如预期的,高亲和力Fc γ RI受体与未修饰的IgG1和IgG4(S241P)以良好的亲和力结合。修饰的IgG1同型以及IgG2和IgG4(S241P、L248E)未能与Fc γ RI结合。与Fc γ RI相比,其余Fc γ 受体对不同嵌合抗体相互作用的亲和力低得多。如所预期的,未修饰的IgG1与所有四个较低亲和力受体的结合最强,而IgG1的修饰形式与这些受体的结合却明显降低。IgG2和IgG4(S241P)表现出与Fc γ RIIA和B的某些结合,但仅与Fc γ RIIIA和B边缘性结合。

[0284] 2.ELISA测试评估工程化的Fc部分与C1q复合物的结合

[0285] 测试嵌合抗体20.1作为不同的IgG同型与C1q复合物的结合,以确定它们激活补体系统的能力。

[0286] 在U型底的96孔板中,在2%BSA/DPBS中制备了2.5倍稀释的一系列(从10 μ g/ml到0.04 μ g/ml)的不同同种型的纯化嵌合20.1。在Nunc Immuno MaxiSorp 96孔平底微量滴定

板(ThermoFisher Scientific,Loughborough,UK)上预涂100 μ l/孔的该滴定系列,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天,将板用PBST洗涤2次,并在室温下用2%BSA/DPBS封闭1小时,然后用PBST洗涤五次。将在2%BSA/PBS中稀释至5 μ g/ml的纯化的补体蛋白C1q(Pathway Diagnostics Ltd,Dorking,UK)添加到板中(100 μ l/孔)并在室温下孵育1小时。用PBST洗涤五次后,用抗C1q-HRP(Abcam,Cambridge,UK)(100 μ l/孔,在2%BSA/DPBS中稀释100倍)在室温下检测C1q复合物的结合1小时。用PBST洗涤五次后,检测到与TMB底物(ThermoFisher Scientific,Loughborough,UK)的结合,然后用3M HCl终止反应,在Dynex Technologies MRX TC II读板器上于450nm处读取吸光度并绘制结合曲线。

[0287] 如所预期的,仅未修饰的IgG1同型显示与C1q的较好结合,而其他同型显示极少的结合至无结合(数据未显示)。

[0288] 3.工程化Fc片段的选择

[0289] 所有测试的同型与Fc γ 受体和C1q复合体的相对结合描述于表6中。

[0290] 表6:所有同型与Fc γ 受体和C1q复合物的相对结合

同型	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa	Fc γ RIIIb	C1q
IgG1						
IgG1 WT	++++	++	++	++	++	++++
IgG1 N314A	++	-	-	-	-	-
IgG1 L247F, L248E, P350S	-	+	+	+/-	+/-	-
IgG2						
IgG2 WT	-	++	+	+/-	+/-	+/-
IgG4						
IgG4 S241P	++++	++	++	+/-	+/-	-
IgG4 S241P, L248E	-	+	++	-	+/-	-

[0293] 两种工程化IgG1 L247F、L248E、P350S和IgG4 S241P、L248E Fc片段是唯一与Fc γ I受体和C1q复合物完全未结合的片段。

[0294] 基于获得的结果,选择两种工程化IgG1 L247F、L248E、P350S和IgG4 S241P、L248E同型以进一步表征。

[0295] 6种人源化抗体的产生

[0296] 克隆3种选定的人源化变体,使其与2种选择的工程化Fc片段融合,从而产生6种不同的候选物:mAb 1-mAb 6。

[0297] 表1中描述的mAb1-mAb6的实例可以使用常规抗体重组生产和纯化方法来产生。

[0298] 例如,将编码序列克隆到生产载体中以便在哺乳动物生产细胞系中重组表达。

[0299] 下表7和8提供了可用于实施本发明,特别是用于生产衍生自本公开的鼠7.2的核酸、表达载体和人源化抗体的详细的氨基酸和核苷酸序列。

[0300] 表7:用于实施本发明的有用的氨基酸和核苷酸序列的简要说明

[0301]

SEQ ID NO:	类型	序列说明
1	aa	mAb 7.2 的人源化重链可变区 VH2
2	aa	mAb 7.2 的人源化轻链可变区 Vκ1
3	aa	mAb 7.2 的人源化轻链可变区 Vκ2

[0302]

4	aa	mAb 1 和 2 (VH2 7.2 沉默 IgG1)全长重链
5	aa	mAb 4 和 5 (VH2 7.2 沉默 IgG4)全长重链
6	aa	mAb 1 和 4 (Vk1 7.2)全长轻链
7	aa	mAb 2 和 5 (Vk2 7.2)全长轻链
8	nt	mAb 1 和 2 (VH2 7.2 沉默 IgG1)全长重链
9	nt	mAb 4 和 5 (VH2 7.2 沉默 IgG4)全长重链
10	nt	mAb 1 和 4 (Vk1 7.2)全长轻链
11	nt	mAb 2 和 5 (Vk2 7.2)全长轻链
12	aa	mAb 7.2, 1, 2, 4 和 5 的 HCDR1
13	aa	mAb 7.2, 1, 2, 4 和 5 的 HCDR2
14	aa	mAb 7.2, 1, 2, 4 和 5 的 HCDR3
15	aa	mAb 7.2, 1, 2, 4 和 5 的 LCDR1
16	aa	mAb 7.2, 1, 2, 4 和 5 的 LCDR2
17	aa	mAb 7.2, 1, 2, 4 和 5 的 LCDR3
18	aa	人 BTN3A1
19	aa	人 BTN3A2
20	aa	人 BTN3A3
21	aa	用于重组蛋白生产的食蟹猴(<i>m. fascicularis</i>)BTN3A1 胞外域
22	aa	用于重组蛋白生产的食蟹猴(<i>m. fascicularis</i>)BTN3A2 胞外域
23	aa	用于重组蛋白生产的食蟹猴(<i>m. fascicularis</i>)BTN3A3 胞外域

[0303] 表8:用于实施本发明的有用的氨基酸和核苷酸序列的简要说明

[0304]	SEQ ID NO:	描述氨基酸或核苷酸序列如下:
	SEQ ID NO:	描述氨基酸或核苷酸序列如下:
	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYMYWVKQRPQGGL WIGEINPNNGGTFNEKFKNRATLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVY YCSREDDYDGTPTFAMDYWGQGTLLTVSS
	2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKAPKLLI YKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQGQTYPYT FGQGTKLEIK
[0304]	3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKAPKLLI YKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQGQTYPYT FGQGTKLEIK
	4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYMYWVKQRPQGGL WIGEINPNNGGTFNEKFKNRATLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVY YCSREDDYDGTPTFAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEF EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI

[0305]

	AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYMYWVKQRPQGGL WIGEINPNNGGTKFNEKFKNRATLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVY YCSREDDYDGTPTFAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKAPKLLI YKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQGQTYPYT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKAPKLLI YKASNLHTGVPSRFTGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQGQTYPYT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
8	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTACCAG ATACTATATGTATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAG TGGATTGGAGAGATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAAGTTCAATG AGAAGTTCAAGAACAGGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCATCA GCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGG CGGTCTATTATTGTTCAAGAGAGGATGATTACGACGGGACCCCTT TGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCT GACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCTTACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAA CCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTA TAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT

[0306]

	CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTGA
9	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACCAG ATACTATATGTATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAG TGGATTGGAGAGATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAAGTTCAATG AGAAGTTCAAGAACAGGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCATCA GCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGG CGGTCTATTATTGTTCAAGAGAGGATGATTACGACGGGACCCCCCTT TGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAG GAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCA CCATGCCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGT TCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAA AACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCT AACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCTGGGTTGA
10	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGT TTGGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCCTAAATC TTGATCTATAAGGCTTCCAACCTGCACACAGGCGTCCCATCAAGAT TACTGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTACATTACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAA ACTTATCCATACACGTTCCGACAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG TTAG
11	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGT TTGGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCCTAAATC

[0307]

	TTGATCTATAAGGCTTCCAACCTGCACACAGGCGTCCCATCAAGAT TtagTGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACATTCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAA ACTTATCCATACACGTTCCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG TTAG
12	RYYMY
13	EINPNNGGTFNEKFKN
14	EDDYDGTPFAMDY
15	HASQNINVWLS
16	KASNLHT
17	QQGQTYPYT
18	MKMASFLAFLLLNFRVCLLLLQLLMPHSAQFSVLGPSGPILAMVGEDA DLPCHLFPTMSAETMELKWVSSSLRQVVNVYADGKEVEDRQSAPYRG RTSILRDGITAGKAALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDIFYEKALVELKV AALGSDLHVDVKGYKDGGIHLERSTGWYPQPQIQWSNNKGENIPTV EAPVVADGVGLYAVAASVIMRGSSGEGVSTIRSSLLGLEKTASISIAD PFFRSAQRWIAALAGTLPVLLLLLGGAGYFLWQQQEEKKTQFRKKKR EQELREMAWSTMKEQSTRVKLLEELRWRSIQYASRGERHSAYNEW KKALFKPADVILDPKTANPILLVSEDQRSVQRAKEPQDLPDNPFRFNW HYCVLGCESFISGRHYWEVEVGDRKEWHIGVCSKNVQRKGWVKMTP ENGFWTMGLTDGNKYRTLTEPRTNLKLPKPPKKVGVFLDYETGDISFY NAVDGSHIHTFLDVSFSEALYPVFRILTLEPTALTICPA
19	MKMASSLAFLLLNFHVSLLLVQLLTPCSAQFSVLGPSGPILAMVGEDA DLPCHLFPTMSAETMELKWVSSSLRQVVNVYADGKEVEDRQSAPYRG RTSILRDGITAGKAALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDIFYEKALVELKV AALGSNLHVEVKGYEDGGIHLERSTGWYPQPQIQWSNAKGENIPAV EAPVVADGVGLYEVAASVIMRGSSGEGVSCIIRNSLLGLEKTASISIAD PFFRSAQPWIAALAGTLPILLLLLAGASYFLWRQQKEITALSSEIESEQE MKEMGYAATEREISLRESLQEELKRKKIQYLTRGEESSSDTNKSA
20	MKMASSLAFLLLNFHVSLFLVQLLTPCSAQFSVLGPSGPILAMVGEDA DLPCHLFPTMSAETMELRWVSSSLRQVVNVYADGKEVEDRQSAPYRG RTSILRDGITAGKAALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDIFYEKALVELKV AALGSDLHIEVKGYEDGGIHLERSTGWYPQPQIKWSDTKGENIPAVE APVVADGVGLYAVAASVIMRGSSGGGVSCIIRNSLLGLEKTASISIADP FFRSAQPWIAALAGTLPISLLLLAGASYFLWRQQKEKIALSRETERERE MKEMGYAATEQEISLREKLQEELKWRKIQYMARGEKSLAYHEWKMA LFKPADVILDPDTANAILLVSEDQRSVQRAEPRDLPDNPFRFEWRYC VLGCENFTSGRHYWEVEVGDRKEWHIGVCSKNVERKKGWVKMTPE NGYWTMGLTDGNKYRALTEPRTNLKLPPEPRKVGIFLDYETGEISFYN ATDGSHIYTFPHASFSEPLYPVFRILTLEPTALTICPIKEVESSPDPLVP DHSLETPLTPGLANESGEPQAEVTSLLLPAHPGAEVSPSATTNQNHKLQ ARTEALY
21	MGSSLAFLLLSFHVCVLLLQLLMPHSAQFAVVGGPPGPILAMVGEDADL

[0308]		PCHLFPTMSAETMELRWVSSNLRQVVNVYADGKEVEDRQSAAYRGR TSILRDGITAGKAALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDYFYEKALVELKVA ALGSDLHIDVKG YEDGGIHL ECRSTGWYPQPQIRWSNDKGENIPAVEA PVFVDGVGLYAVAASVILRGSSGEGVSC TIRSSLLGLEKTTSISIA G HHHHHH
	22	MGSSLAFLLLNFHVSFFLVQLLTPCSAQFSVLGSPGILAMVGEDADLP CHLFPTMSAETMELRWVSSSLRQVVNVYADGKEVEDRQSAPYRGRTS ILRDDIAAGKAALRIHNVTASDSGKYLCYFQDADFYKALVELKVAAL GSNLHVEVKGYEDGGIHL ECRSTGWYPQPKIQWSNAKGQNIPAVEAP VVADGVGLYAVAASVIMRGSSGESVSCIIRNSVLGLEKTASISIA D HHHHHH
	23	MANFLAFLLLNFRVCLLLVQLLTPCSAQFAVLGPHGPILAMVGEDVDL PCHLFPTMSAETMELRWVSSSLRQVVNVYSDGKEVEDRQSAPYRGRT SILRDGITAGKAALRIHNVTASDSGKYLCYFQDGDYFYEKALVELKVA A LGSDLHIEVKGYEDGGIHL ECRSTGWYPQPQIQWSNTKGQHIPAVKAP VVADGVGLYAVAASVIMRGSSGEGVSCIIRNSLLGLEKTASISIT D HHHHHH

[0309] 6种人源化变体的可开发性性能

[0310] 1.细胞系的产生

[0311] a.表达载体的构建

[0312] 将编码重链和轻链的基因序列克隆到载体中。该基因系统用于在CHO细胞中表达抗体。抗体表达在EF1 α 启动子的控制下。表达载体带有独特的基因元件,其可保护转基因免受周围染色质的沉默效应(Girod等,2007)。转录保持在最高水平,并且与转基因整合位点无关,从而导致稳定和高水平的蛋白质表达。

[0313] b.细胞系发育

[0314] CHO宿主细胞系衍生自自美国124型培养物保藏中心(ATCC)的CHO-K1 CCL-61细胞,并且已适应于在化学成分确定的BalanCD Growth A培养基(Irvine Scientific)中悬浮生长。使用Neon转染系统(Invitrogen)通过电穿孔转染细胞。

[0315] c.使用ClonePix FL设备进行单细胞克隆

[0316] 为了在整个过程中保持细胞环境不变,使用相同的培养基(BalanCD Growth A, Irvine Scientific)作为基础培养基进行转染、单细胞克隆和生产。每个载体转染后,施用嘌呤霉素选择压力以产生稳定的库。将稀释的细胞接种到半固体培养基(CloneMedia[®]; Molecular De-vices)中,并将板在37℃和5%CO₂的潮湿培养箱中培养。使用来自Molecular Devices的ClonePix[™]FL Imager挑选扩增的菌落,并将其转移到96孔板中,然后先在24孔,再在6孔TC板中扩增。

[0317] d.分批补料性能评估

[0318] 使用Cell Boost7 A+7B进料(GE Healthcare,USA),在10天的分批补料过程中,通过细胞生长性能和产量的标准,在125ml摇瓶中评估单个克隆的生长和生产性能,以选择最佳克隆。分批补料培养以 0.3×10^6 细胞/ml的细胞浓度开始。

[0319] 表9总结了细胞生长和产量的结果。

[0320] 2.可制造性评估的样品的制备

[0321] 通过从澄清的CHO细胞上清液库中用Protein A捕获来纯化每种候选抗体:每个变体需要两个库,以确保有足够的材料进行测试。通过紫外线法确定所有捕获后样品的蛋白

质浓度。大多数样品的样品回收率和收率均大于80%，所有变体的产率均相似。然后，使用30kDa MWC0离心过滤器单元将每种抗体缓冲液交换成25mM组氨酸、125mM NaCl (pH 6.0)，直到流通材料达到制剂的目标pH。在交换步骤中，对于任何变体，在交换期间都没有蛋白质沉淀或流量减慢的现象。缓冲液交换完成后，用制剂缓冲液将每种变体样品的浓度调节至1.0mg/mL，然后添加10%PS-80至终浓度0.02%PS-80。

[0322] 3. 热稳定性评估

[0323] 进行差示扫描荧光法分析以评估和比较测试的抗体变体的热稳定性。每个变体进行三次重复分析，并确定每个观察到的热转变 T_{onset} 、 T_{agg} 和 T_m 的平均值(数据未显示)。

[0324] 对于所有测试的变体，在 T_{onset} 和 T_m 值之间均未观察到显著差异。所有抗体的 T_{m1} 值确定为61℃，所有抗体的 T_{onset} 值确定为54-55℃。基于胶体稳定性曲线图确定的 T_{agg} 值在71-78℃的范围内。

[0325] 总之，所有4个选择的变体均表现出可比的热稳定性：观察到的变化未导致测试抗体之间的热稳定性发生显著变化。

[0326] 4. 强制降解研究

[0327] a. 搅拌

[0328] 每个变体的样品在室温下在设定为500rpm的定轨振荡器上经受搅拌应力。每个变体的一个样品搅拌24小时，另一个样品搅拌48小时。每个变体放一小瓶在室温下保存至多48小时作为对照。与对照相比，搅拌后的样品未观察到外观变化：观察到所有样品均为澄清、无色且无可见颗粒(数据未显示)。另外，通过UV法测定的总蛋白质含量没有显著变化(数据未显示)。

[0329] 通过SEC、降低的CGE、未降低的CGE和icIEF方法评估了搅拌胁迫对一组变体的稳定性的影响(数据未显示)。在室温下储存的搅拌对照样品和经搅拌胁迫样品之间，未观察到被测抗体的稳定性发生显著变化，也未观察到降解物的累积随时间变化的明显趋势。对于所有对照和搅拌样品，在SEC分析中确定的主峰百分比均 $\geq 99.2\%$ 。在R-CGE分析中，所有对照样品和搅拌样品的主峰百分比均 $\geq 98.5\%$ 。NR-CGE分析显示，对照组和受胁迫样品之间没有显著趋势或主峰%的变化。总之，在所有候选变体之间均未观察到稳定性的显著差异。

[0330] b. 冻-融胁迫

[0331] 将每个候选物的三个样品等分到Eppendorf管中，并经受冻-融胁迫。将样品储存在 $-75 \pm 10^\circ\text{C}$ 下，然后在室温下解冻。每个候选物的一个样品经受3次冻融周期；另一个经受6次冻融周期；第三个样品经受10个周期。观察到所有受胁迫样品是澄清、无色的且没有可见的颗粒(数据未显示)，且通过UV法测定的总蛋白质含量没有显著变化(数据未显示)。

[0332] 通过SEC、降低的CGE、未降低的CGE和icIEF方法评估了冻融胁迫对一组变体的稳定性的影响(数据未显示)。基于SEC、R-CGE和NR-CGE分析，冻融胁迫对抗体的稳定性没有影响。

[0333] icIEF分析揭示了被测抗体电荷异质性的显著变化。与常规对照相比，基本变体的浓度在连续的F/T周期中降低，而在 $10 \times \text{F/T}$ 周期中，基本变体的浓度最低。唯一的例外是变体IgG1 7.2VH2/VK1，在所有测试的F/T周期中，其基本变体的浓度的降低均处于相同水平(参见表9)。在变体mAb1、mAb2和mAb3中，经过 $10 \times \text{F/T}$ 周期后，基本变体分别减少了1.0%、

1.3%和3.4%。基本种类浓度的降低与主峰百分比的增加有关。在变体mAb4、mAb5和mAb6中,基本种类的减少分别为4.8%、2.8%和4.7%。变体mAb4的变化主要与主峰百分比的增加有关,而变体mAb5和mAb6的变化与主峰%和酸性变体%的增加均相关。

[0334] 总体而言,已确定对变体mAb1(IgG1 7.2VH2/VK1)和mAb2(IgG1 7.2VH2/VK2)观察到了最高的抗冻融胁迫变化的能力。

[0335] c.酸性pH胁迫

[0336] 在室温下,使每个候选物的样品经受酸性pH胁迫:将每个样品用HCl调节至pH 3.5,并在室温下放置2小时、4小时和24小时,然后用1M Tris (pH 7.0)中和样品。观察到所有样品均为澄清、无色且无可见颗粒(数据未显示),且通过UV法测定的蛋白质浓度没有显著变化(数据未显示)。

[0337] 通过SEC、降低的CGE、未降低的CGE和icIEF方法评估了酸性pH胁迫对一组变体的影响(数据未显示)。通过R-CGE或NR-CGE分析,与48小时室温(RT)对照相比,暴露于低pH值的样品未检测到降解物随时间推移积累的显著变化。在电荷异质性分析中,所有经受酸性pH胁迫的样品中基本变体的浓度均降低,但是随着时间的推移未观察到明显的趋势。

[0338] 对于变体mAb1(IgG1 7.2VH2/VK1)和mAb2(IgG1 7.2VH2/VK2),观察到酸性胁迫对基本变体减少的影响总体最低。该结果与通过icIEF在冻融研究中获得的结果非常一致。在SEC分析中,观察到所有变体在暴露于酸性胁迫下都会积累一些聚集体,这与主峰%的降低有关,但是随着时间的推移,没有观察到明显的趋势。通常,与IgG1变体相比,IgG4变体的聚集体积累高出约9倍。对于所有酸性胁迫样品,IgG1变体的聚集体累积量为0.3%-1.0%,而对于IgG4变体,对受胁迫样品的累积量为4.3%-7.8%,这显著更高(参见表9)。

[0339] 总之,已确定在变体mAb1(IgG1 7.2VH2/VK1)和mAb2(IgG1 7.2 VH2/VK2)观察到了最高的耐酸性胁迫能力。

[0340] d.热胁迫

[0341] 每个变体的样品在50℃的加热块中经受3天、1周和2周的热胁迫,然后与2-8℃下储存的一组常规对照样品进行比较。定期进行样品的外观测试,未观察到相分离、不透明度变化或沉淀的表现。观察到所有样品在所有时间点均为澄清、无色且无可见颗粒(数据未显示)。另外,通过UV法确定的蛋白质浓度没有显著变化(数据未显示)。

[0342] 通过SEC、R-CGE、NR-CGE和icIEF方法评估了热胁迫对一组变体的影响。结果表明,所有变体均易受热胁迫。

[0343] 在SEC分析中,观察到所有测试变体的聚集体浓度随时间变化而增加的明显趋势。与IgG1相比,IgG4变体的聚集体积累明显更高。两周后,IgG4变体的总聚集%增加范围为33.7%-44.7%,而IgG1变体仅为13.0%-18.2%(参见表9)。此外,与对照mAb3(IgG1 20.1VH3/VK1)相比,mAb1(IgG1 7.2VH2/VK1)和mAb2(IgG1 7.2VH2/VK2)变体积累较少的聚集体。

[0344] 在R-CGE分析中,观察到所有测试变体的纯度随时间变化而下降的明显趋势(定义为LC+HC百分比(%)的下降),但是,在它们之间的没有发现稳定性上的显著差异。对于所有测试的抗体,样品降解的水平是可比较(数据未显示)。同样地,NR-CGE数据展示了所有测试变体的纯度随时间变化而下降的明显趋势(定义为主峰的降低)。与IgG1相比,观察到IgG4变体的纯度明显较低(数据未显示)。两周后,IgG4变体的纯度%降低了34.8%-41.7%,而

IgG1变体的纯度仅降低20.0%至30.0% (数据未显示)。此外,mAb1 (IgG1 7.2VH2/VK1) 和mAb2 (IgG1 7.2VH2/VK2) 变体的降解程度低于mAb3 (IgG1 20.1VH3/VK1)。对于IgG1抗体,主峰的减少主要伴随着前主峰杂质(片段)的增加。但是,对于IgG4抗体,观察到随着主峰的降低,前主峰杂质(片段)和后主峰杂质(聚集体)的积累(数据未显示)。该结果与SEC数据高度吻合,其中,与IgG1相比,IgG4抗体的聚集体浓度明显更高。

[0345] IgG4变体的1周样品降解过多,无法通过icIEF进行分析,并且所有变体的2周样品都降解过多,无法进行分析。因此,仅使用3天的数据来评估测试抗体之间电荷异质性的变化。由%主峰确定的纯度差异对于IgG1样品为12.4%-14.4%,对于IgG4样品为16.0%-16.6% (数据未显示)。

[0346] 总之,已证明,与IgG1变体相比,IgG4变体在热胁迫下的降解更多,并且在所有时间点均可观察到。分析表明,mAb1 (IgG1 7.2 VH2/VK1) 和mAb2 (IgG1 7.2VH2/VK2) 变体对热胁迫的敏感性最低,此结果与冻融和酸性pH胁迫的数据一致。

[0347] 根据可开发性能选择最佳候选药物

[0348] 关于细胞系的产量,使用人源化变体mAb1 (7.2VH2/VK1) 获得了最佳结果,mAb1在10天时的活细胞密度提高了 54×10^6 个活细胞/ml。

[0349] 在热稳定性研究中,通过DSF分析在标准基质中评估样品,以确定每个候选物的 T_{onset} 、 T_m 和 T_{agg} 。没有观察到 T_{onset} 和 T_m 的变化,且所有变体的 T_{agg} 都高于70℃。结果表明,mAb1、mAb2、mAb4和mAb5具有可比的热稳定性。

[0350] 在强制降解研究中,将样品置于搅拌、冻融、酸性pH和热胁迫下。结果表明,在相关的胁迫条件下,候选变体在不同程度上易于降解:

[0351] • 任一分析方法均未观察到对搅拌胁迫的显著响应。

[0352] • 通过SEC或CGE方法未观察到对冻-融胁迫的显著响应,但是icIEF分析揭示了测试变体之间电荷异质性的差异,并显示出mAb1 (IgG1 7.2VH2/VK1) 和mAb2 (IgG1 7.2VH2/VK2) 变体对冻-融胁迫引起的变化的耐性最高。

[0353] • 通过icIEF和SEC观察到了对酸性pH胁迫的响应,其中所有候选物在暴露后都会积累一些杂质。mAb1 (IgG1 7.2VH2/VK1) 和mAb2 (IgG1 7.2VH2/VK2) 变体表现出对酸性pH胁迫的最高耐性。

[0354] • 观察到最显著的胁迫响应的是在50℃下储存的样品。SEC、NR-CGE和icIEF分析揭示了样品纯度随着时间显著下降的趋势。与IgG1变体相比,IgG4变体观察到的纯度下降始终更大。在IgG1变体组中,mAb1 (7.2VH2/VK1) 和mAb2 (IgG1 7.2VH2/VK2) 对酸性热胁迫表现出最高的耐性。

[0355] 下表9总结了不同人源化候选物的可开发性能的结果:

[0356] 表9:与所有其他经过测试的人源化变体相比,mAb1人源化候选物具有更高的可开发性能

	名称	候选物	库增长 (10 天 时活细胞密度 /ml) 和 产量 ($\mu\text{g/ml}$)	冻-融胁迫-%基 本变体的降低 ¹ (3 个周期、6 个周期和 10 个 周期)	酸性胁迫-SEC 分析 (24h 后 pH 3.5 时%聚 集体的增加)	热胁迫-SEC 分 析 (50°C 下 2 周后通过 SEC 分析测量的 %Agg 的差 异)
[0357]	mAb1	7.2 VH2/VK1 IgG1	54×10^6 550 $\mu\text{g/ml}$	1.2 1.2 1.0	0.2	13.9
	mAb2	7.2 VH2/VK2 IgG1	30×10^6 330 $\mu\text{g/ml}$	0.9 0.6 1.3	0.8	13.1
	mAb3	20.1	n.d	2.1	0.3	18.3
[0358]		VH3/VK1 IgG1		2.0 3.4		
	mAb4	7.2 VH2/VK1 IgG4	44×10^6 780 $\mu\text{g/ml}$	1.9 1.9 3.0	4.4	33.6
	mAb5	7.2 VH2/VK2 IgG4	39×10^6 475 $\mu\text{g/ml}$	1.6 1.8 2.8	5.1	35.4
	mAb6	20.1 VH3/VK1 IgG4	38×10^6 430 $\mu\text{g/ml}$	2.5 2.4 4.7	6.3	44.6

[0359] ¹基于非四舍五入的结果计算出%基本变体的变化,从相应对照样本中减去受胁迫样本的%基本变体。

[0360] 结论是,mAb1变体在可开发性方面显示出最佳结果,并被选为主要候选物。

[0361] 人源化mAb 7.2变体作为单价和二价分子的功能特性

[0362] 1.Fab和Fab₂片段的制备

[0363] a.胃蛋白酶消化以产生F(ab')₂

[0364] 通过将浆液在5000g下离心2分钟,将50%浆液中固定的胃蛋白酶(Thermo Scientific Kit,cat.No.44988)缓冲液交换至消化缓冲液(20mM乙酸钠,pH 4.4)。弃去上清液,将浆液重悬于1mL消化缓冲液中,然后在5000g 2min再次离心。将该步骤再重复四次(总共五次树脂清洗)。然后,将树脂重悬在消化缓冲液中,直至原始浆液的体积。

[0365] 使用5或10mL Zeba Spin柱(取决于规模)将mAb 4、mAb 5和mAb 6(7.2VH2/VK1、7.2VH2/VK2或20.1VH3/VK1 IgG4变体)缓冲液交换成消化缓冲液,并根据制造商操作说明使用Vivaspin浓缩器(10,000MWC0)将其浓缩至3mg/mL。

[0366] 将3mg/mL的mAb 4、5和6(先在消化缓冲液中缓冲液交换)与固定在树脂上的胃蛋白酶混合,并在37°C旋转孵育1.5-2小时。

[0367] 消化混合物在5000g下离心2分钟。除去上清液,并使用适当的注射器和0.22 μm 的小型过滤器(Merck Millipore,Millex Cat no.SLGV004SL)将其过滤到新的试管中。用1mL PBS洗涤树脂,以5000g离心1min。除去上清液,过滤并与先前的上清液合并。重复洗涤步骤。

[0368] 使用HiLoad 16/600 200 μm 尺寸排阻柱,使用10mM乙酸钠、100mM NaCl(pH 5.5)作为流动相纯化被消化并被过滤的上清液。将对应于洗脱的F(ab')₂片段的级分收集,浓缩并无菌过滤。

[0369] 通过SDS-PAGE、SEC分析和OD_{280nm}读数分析F(ab')₂片段。

[0370] b.木瓜蛋白酶消化以产生Fab

[0371] 通过将浆液在5000g下离心2分钟,将50%浆液中固定的木瓜蛋白酶(Thermo Scientific Kit cat.No.20341)缓冲液交换至消化缓冲液(20mM磷酸钠,10mM EDTA,150mM 半胱氨酸pH 7.0)。弃去上清液,将浆液重悬于较大体积的消化缓冲液中,然后在5000g 2min再次离心。将该步骤再重复四次(总共五次树脂清洗)。然后,将树脂重悬在消化缓冲液中,直至原始浆液的体积。

[0372] 使用5或10mL Zeba Spin柱(取决于规模)将mAb 4、mAb 5和mAb 6(7.2VH2/VK1、7.2VH2/VK2或20.1VH3/VK1 IgG4变体)缓冲液交换成消化缓冲液,并根据制造商操作说明使用Vivaspin浓缩器(10,000MWC0)将其浓缩至3mg/mL。

[0373] 将3mg/mL的mAb 4、5和6(先在消化缓冲液中缓冲液交换)与固定在树脂上的木瓜蛋白酶混合,并在37℃旋转孵育42小时。

[0374] 消化混合物在5000g下离心2分钟。除去上清液,并使用适当的注射器和0.22μm的小型过滤器(Merck Millipore, Millex Cat no.SLGV004SL)将其过滤到新的试管中。用PBS将树脂洗涤3次,在5000g离心1分钟,在每个周期中收集并合并上清液。然后,使用适当的注射器和0.22μm的小型过滤器将合并的级分过滤到新的试管中。

[0375] 首先,将被消化和被过滤的上清液缓冲液交换至1×DPBS(pH7.4),然后首先使用Protein A柱纯化,以去除Fc和未消化的mAb,然后以10mM乙酸钠、100mM NaCl(pH 5.5)作为流动相,使用尺寸排阻(SEC)柱进行精纯(polishing)步骤。将对应于洗脱的Fab片段的级分合并,浓缩并无菌过滤。

[0376] 通过SDS-PAGE、SEC分析和OD_{280nm}读数分析Fab片段。

[0377] 2.使用Biacore测量人源化7.2和20.1Fab、F(ab')₂片段和IgG形式的亲和力

[0378] 为了评估主要(lead)人源化7.2和20.1抗体以其不同形式(Fab、F(ab')₂和IgG)对BTN3A1的亲和力,用运行Biacore T200控制软件V2.0.1评估软件V3.0(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)的Biacore T200(序列号1909913)仪器进行单周期动力学分析。所有单周期动力学实验均在25℃下使用含0.1%BSA的HBS-P+运行缓冲液(pH 7.4)(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)中进行。

[0379] 将BTN3A1 His标记的抗原(Sino Biological, Beijing, China)在运行缓冲液中稀释至最终浓度为0.4μg/mL。在每个周期的开始,使用具有标准胺化学试剂的His捕获试剂盒(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)以10μL/min的流速将BTN3A1-His捕获到预先耦合的CM5传感器芯片的Fc2上。将约34RU、16RU或11RU的固定化水平(RL)(获得约50RU的RMax的不同理论值)分别用于分析Fab、F(ab')₂和IgG。然后,使表面稳定。用纯化的样品(Fab、F(ab')₂和IgG)以40μL/min的流速获得单周期动力学数据,以最大程度地降低任何潜在的传质影响。从Fc2减去来自参照通道Fc1的信号(未捕获抗原),以校正非特异性结合至参照表面的差异。减去BTN3A1-His空白运行的信号(无分析物)以校正表面稳定性的差异。监测浓度递增的五次注射的结合阶段,每次240秒,并在最后一次注射分析物后,测量单次解离阶段1400秒。使用两次注射pH 1.5的10mM甘氨酸-HCl进行芯片表面再生,然后稳定240秒。对于Fab样品,原始传感图适用于1:1模型且对于F(ab')₂和IgG样品,原始传感图适用于二价分析物模型,以符合不同分析物的化合价。计算每种变体的动力学常数(参见表10、11和

12)。

[0380] 表10:单周期动力学IgG分析

IgG (二价拟合)						
样品	K_a1 (1/Ms)	K_a2 (1/Ms)	K_d 1 (1/s)	K_d 2 (1/s)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
mAb 1 (7.2 VH2/VK1)	5.30×10^4	4.21	4.63×10^{-4}	4.40×10^1	69.6	0.063
mAb 2 (7.2 VH2/VK2)	5.97×10^4	2.01×10^{-3}	4.03×10^{-4}	2.41×10^{-2}	68.0	0.144
mAb 3 (20.1 VH3/VK1)	5.63×10^4	5.47×10^{-5}	3.79×10^{-3}	8.60×10^{-5}	56.1	0.042

[0382] 表11:单周期动力学F(ab')₂分析

F(ab') ₂ (二价拟合)						
样品	K_a 1 (1/Ms)	K_a 2 (1/Ms)	K_d 1 (1/s)	K_d 2 (1/s)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
7.2 VH2/VK1 F(ab') ₂	8.33×10^4	6.10	6.66×10^{-4}	3.24×10^1	78.2	0.033
7.2 VH2/VK2 F(ab') ₂	1.46×10^5	3.40	3.94×10^{-4}	5.46×10^1	58.9	0.126
20.1 VH3/VK1 F(ab') ₂	9.23×10^4	5.03×10^{-5}	4.16×10^{-3}	8.10×10^{-5}	61.5	0.326

[0384] 表12:单周期动力学Fab分析

Fab (1:1 拟合(fitting))					
样品	K_a (1/Ms)	K_d (1/S)	K_D (nM)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
7.2 VH2/VK1 Fab	1.98×10^5	6.39×10^{-4}	3.22	66	0.114
7.2 VH2/VK2 Fab	2.22×10^5	6.69×10^{-4}	3.01	61	0.091
20.1 VH3/VK1 Fab	1.76×10^6	3.57×10^{-2}	20.30	55	1.330

[0386] 3. 根据亲和力性能选择最佳候选物

[0387] 20.1和7.2人源化变体在亲和力性能方面显示出显著差异。这些差异可以用IgG和F(ab')₂形式观察到,但在Fab片段中差距甚至更高:实际上,20.1的平均K_D为20.30nM,而7.2的平均K_D为3.22 (VH2/VK1) 或3.01 (VH2/VK2)。

[0388] 4.mAb 1与原代T细胞和其他细胞系的结合亲和力

[0389] 接下来,已经通过流式细胞仪评估mAb1与人原代T细胞以及包括WT和BTN3A敲除且各自用BTN3A1,BTN3A2或BTN3A3亚型重构的各种细胞系的结合亲和力(数据未显示)。表13中汇总了每种测试细胞型获得的EC₅₀值。

[0390] 在BTN3A KO细胞中获得的数据清楚地表明,mAb1特异性结合其靶标。此外,单个亚型重构表明,mAb1以可比的亲和力识别BTN3A1、BTN3A2和BTN3A3。所有其他测试的细胞对mAb1结合均呈阳性,EC₅₀值范围从Burkitt淋巴瘤Daudi细胞系的9.6nM到结直肠腺癌细胞系HT29的112.3nM。

[0391] 表13:mAb1与人细胞的结合亲和力

细胞	描述	门 控 (Gating)	EC ₅₀ µg/mL (+/-sem)	EC ₅₀ (× 10 ⁻⁹ M) (+/-sem)
人 HV PBMC	原代 (n=6)	CD3+	5.25 (+/-0.57)	34.9 (+/-3.8)
Daudi	Burkitt's 淋巴瘤(n=5)	NA	1.44 (+/-0.16)	9.6 (+/-1.04)
L-IPC (PDAC087T)	胰腺导管腺癌(n=4)	NA	26.26 (+/-4.4)	175.1 (+/-29.3)
HT29	大肠腺癌(n=3)	NA	16.84 (+/-3.1)	112.3 (+/-20.6)
A549	肺癌 (n=6)	NA	6.53 (+/-1.8)	43.56 (+/-12.3)
HUVEC	内皮细胞 (n=2)	NA	12.8 (+/-1.98)	85.2 (+/-13.2)
HEK293T WT	胚胎肾(n=3)	NA	6.2 (+/-0.44)	41.3 (+/-2.95)
HEK293T BTN3KO	胚胎肾; 对于 BTN3A1、A2、A3, 全 敲除 (n=3)	NA	NA	NA
HEK293T BTN3KO+3A1- CFP	胚胎肾; 对于用 BTN3A1-CFP 瞬时转染 的 BTN3A1、A2、	CFP+	2.4 (+/-0.34)	15.9 (+/-2.3)
	A3, 全敲除 (n=4)			
HEK293T BTN3KO+3A2- CFP	胚胎肾; 对于用 BTN3A2-CFP 瞬时转染 的 BTN3A1、A2、 A3, 全敲除 P (n=5)	CFP+	1.88 (+/-0.39)	12.5 (+/-2.6)
HEK293T BTN3KO+3A3- CFP	胚胎肾; 对于用 BTN3A3-CFP 瞬时转染 的 BTN3A1、A2、 A3, 全敲除(n=5)	CFP+	1.75 (+/-0.11)	11.68 (+/-0.72)
NA: 不适用				

[0394] 5.mAb1无脱靶结合

[0395] 通过Retrogenix技术评估了mAb1与其他非BTN3A分子脱靶结合的可能性。这项工作旨在通过筛选表达>5000的人膜受体或在HEK293细胞(Retrogenix platform)表面表达的分泌蛋白的细胞阵列来证明脱靶结合的存在。

[0396] 在细胞固定前后,对mAb1与未转染的HEK293细胞以及与过表达BTN3A1的细胞结合

水平的研究表明,固定细胞上的5 μ g/ml是合适的筛选条件。在这种条件下,筛选mAb1,以与人HEK293细胞结合,该HEK293细胞单独表达5528个人类蛋白,包括细胞表面膜蛋白和细胞表面束缚的分泌蛋白。这显示出十个初步命中(primary hit)。

[0397] 每个初步命中(hit)均与两个对照受体(CD20和EGFR)一起重新表达,并用5 μ g/ml的mAb1、5 μ g/ml的同型对照抗体以及其他阳性和阴性对照处理进行重新测试。除去五个非特异性命中(hit)后,测试抗体仍余下5个特异性相互作用。所有5个特异性命中都与BTN3A相关:BTN3A1的2个亚型,BTN3A2的2个亚型和BTN3A3的1个亚型。

[0398] 研究结论是,未鉴定出mAb1的脱靶相互作用,表明mAb1对其BTN3A表位具有高度特异性。

[0399] 6.mAb1介导V γ 9V δ 2T细胞活化和肿瘤细胞杀伤

[0400] 一开始,小鼠抗BTN3A mAb被证明可触发V γ 9V δ 2T细胞识别BTN3A,介导活化导致(i)人PBMC中该特定亚群的增殖,(ii)细胞因子(IFN γ 和TNF α)的产生,和(iii)感染或转化的靶细胞的细胞溶解(例如通过穿孔素、颗粒酶、TRAIL)(Harly等,Blood,2012&Benyamine,A.等,2016,Oncoimmunology 5,e1146843)。

[0401] 不受任何特定理论的束缚,mAb1可能的作用机制是其与肿瘤靶细胞表面表达的BTN3A的结合会触发构象变化,从而使其信号传递至V γ 9V δ 2T细胞上的反受体。抗BTN3A抗体的活性通常使用体外试验进行评估,该试验基于肿瘤细胞系(靶标)与先前从健康供体的PBMC扩增10-14天的原代人V γ 9V δ 2 T细胞(效应子),在rHuIL-2(200UI/mL)和氨基双膦酸盐(Zometa,1 μ M)的存在下,共培养。在扩增阶段结束时,通过流式细胞仪评估V γ 9V δ 2T细胞的纯度,然后将这些细胞冷冻以备将来使用。实验前一天,将扩增的V γ 9V δ 2 T细胞解冻,用200UI/mL rHuIL-2培养过夜,以维持体外存活率。共培养后,通过流式细胞仪检测 γ δ T细胞上CD107a/b的表达,或通过量化Caspase3/7活化来监测V γ 9V δ 2 T细胞的活化,作为靶细胞杀伤的测量。

[0402] 首先,将来自3种不同健康供体的PBMC的人V γ 9V δ 2T细胞与Daudi细胞系(ATCC-CCL213;Burkitt's淋巴瘤)共培养,并增加mAb1的浓度。4小时后,通过流式细胞仪分析V γ 9V δ 2T细胞的CD107a/b表达。结果显示,与浓度相关的表达CD107a/b的V γ 9V δ 2T细胞的百分比增加,平均EC₅₀为0.89nM(+/-0.39)(图1)。同时,我们评估了V γ 9V δ 2 T细胞对mAb1脉冲Daudi细胞的细胞溶解活性。如图1所示,mAb1以浓度依赖性方式诱导靶细胞凋亡,EC₅₀为0.35nM。另外,使用来自不同组织来源的肿瘤细胞系测试了V γ 9V δ 2T细胞活化(CD107a/b;图1上图)和肿瘤细胞裂解(Casp3/7;图1下图),并与Daudi细胞进行了比较。结果显示,通过mAb1结合L-IPC(胰腺导管腺癌)、A549(肺癌上皮细胞)和HT29(结直肠腺癌)细胞系诱导了V γ 9V δ 2 T细胞活化和随后的肿瘤细胞溶解。

[0403] 7.mAb1增强各种表达BTN3A的人细胞系的V γ 9V δ 2 T细胞杀伤,无论其组织来源如何

[0404] a.材料和方法

[0405] 肿瘤细胞培养

[0406] HL-60是衍生自急性早幼粒细胞白血病的人早幼粒细胞细胞系。Daudi是衍生自Burkitt淋巴瘤的人B淋巴母细胞系。Jurkat是一种急性T细胞白血病细胞系。

[0407] HT-29和HCT116是衍生自大肠腺癌的人上皮细胞。

[0408] PC3和DU145衍生自前列腺癌(分别是转移位点、骨骼和大脑)。

[0409] SUM159和MDA-MB-231是三阴性乳腺癌(TNBC)细胞系。

[0410] HL60、Daudi、Jurkat、DU145和MDA-MB-231细胞在37℃/5%CO₂下RPMI Glutamax、10%FBS;1mM丙酮酸钠中培养。将PC3和HT-29在DMEM 10%FBS、1mM丙酮酸钠中于37℃/5%CO₂下培养。HCT116在10%SVF、McCoy 5a培养基中培养。SUM159在培养基F12 Nut Mix 1X+Glutamax、5%SVF、氢化可的松2mg/ml、胰岛素同源物2mg/ml和非必需氨基酸中培养。

[0411] 体外V γ 9V δ 2 T细胞扩增

[0412] 用Ficoll密度梯度离心机离心获自法国普罗旺斯地区阿尔卑斯大区(France)的外周血,分离外周血单核细胞(PBMC)。为扩增V γ 9V δ 2T细胞,在rHuIL-2(200UI/mL)和氨基双膦酸盐(唑来膦酸盐,1 μ M)存在下,将50.106PBMC以 1.5×10^6 细胞/ml重悬在含有rMI1640,以及10%FBS和1%丙酮酸钠的75cm²烧瓶中10-14天。从第5天起,每2或3天更新一次rHuIL-2,并将细胞保持在 1×10^6 /ml。在扩增阶段结束时,通过流式细胞仪评估V γ 9V δ 2T细胞的纯度,如果V γ 9V δ 2T细胞的数量达到活细胞的80%,则将这些细胞冷冻在FBS20%DMSO中以备将来使用。

[0413] 从人PBMC中纯化V γ 9V δ 2T细胞

[0414] 将新鲜的人PBMC以50.106个细胞/ml重悬于PBS+2%FBS+1mM EDTA中。根据制造商的操作说明,使用EasySep™人 γ / δ T细胞分离试剂盒(Stemcell#19255)分离V γ 9V δ 2。在该过程结束时,通过流式细胞仪测量细胞纯度。活CD3+V γ 9+细胞超过80%。

[0415] V γ 9V δ 2 T细胞杀伤测定

[0416] 在mAb1或相关同型对照存在下,将10000个扩增的或新鲜的V γ 9V δ 2 T细胞与肿瘤细胞系在RPMI 1640+谷氨酸,10%FBS+1mM NaPy中以指定比例(E:T 1:1或1:5)下,在96孔板中共培养。rHuIL-2以20IU/ml加到共培养物中。在指定的时间后,使用Glo试剂(Promega#G7572)测量ATP,该试剂产生与活细胞数量成比例的荧光信号。

[0417] b. 结果

[0418] 除了基于靶细胞半胱天冬酶3/7染色以监测与V γ 9V δ 2 T细胞共培养时的杀伤的方法外,我们还开发了一种基于对培养物中活细胞数量进行评估的补充途径,该途径基于对代谢活性细胞的指标ATP存在进行的定量。

[0419] 通过该测定,在mAb1或相关同型对照+/-rHuIL-2(20IU/ml)的存在下,在与扩增的V γ 9V δ 2 T细胞(比例E:T 1:1)共培养24后,我们监测了急性髓样白血病细胞系HL60-WT或-BTN3A-KO的存活率(图2A)。结果显示,在mAb1的存在下,HL60-WT的存活率呈浓度依赖性降低,这表明活化的V γ 9V δ 2 T细胞可有效依赖BTN3A杀伤靶肿瘤细胞。用体外扩增或新鲜分离的V γ 9V δ 2 T细胞进行了类似的实验(分别为图2B和2C),并在4天时间内测量了细胞活力。

[0420] 图2B显示,体外扩增的V γ 9V δ 2 T细胞以浓度依赖的方式控制HL60-WT的增殖。rHu-IL2的添加可以随时间改进效应细胞的杀伤能力,这可能是为原代T细胞体外培养提供所需的存活信号。从人PBMC中分离的新鲜V γ 9V δ 2 T细胞与HL60-WT以E:T比例1:1和1:5共培养4天,获得了相似的结果。这些结果表明,单一V γ 9V δ 2 T细胞在mAb1介导的活化下反复参与并杀伤多个肿瘤靶标的能力(图2C)。

[0421] 接下来,我们使用该测定来监测mAb1介导的V γ 9V δ 2 T细胞对来自不同组织起源

(结肠、乳腺癌、前列腺癌、T淋巴瘤和Burkitt淋巴瘤)的BTN3A表达细胞系的杀伤活性。HT29、PC3、DU145、MDA-MB-231、HCT116、SUM159、Jurkat和Daudi细胞与体外扩增的V γ 9V δ 2 T细胞在增加的mAb1浓度下共培养过夜,并测量细胞活力。结果证实,无论细胞组织来源如何,mAb1增强了多种BTN3A表达人细胞系的V γ 9V δ 2 T细胞杀伤。

[0422] 表15:在不同浓度的mAb1存在下,将10,000个肿瘤细胞与体外扩增的V γ 9V δ 2 T细胞共培养24小时(比例E:T 1:1)。使用检测ATP水平的生物荧光测定法测量细胞活力。显示了生物荧光值 $\times 10^5$ 。

肿瘤细胞系	组织来源	无 mAb		mAb1 0.1ug/ml		mAb1 1ug/ml		mAb1 10ug/ml	
		供体 A	供体 B	供体 A	供体 B	供体 A	供体 B	供体 A	供体 B
HT29	结肠	68,0	55,1	67,6	58,1	54,2	49,2	41,0	40,0
PC3	前列腺	86,2	73,5	83,3	68,5	48,6	49,7	36,8	38,0
DU145	前列腺	75,7	69,6	65,1	64,4	33,6	41,8	22,1	26,8
MDA-MB-231	乳腺	66,5	59,8	68,2	59,8	57,6	54,7	43,4	44,4
HCT116	结肠	114,1	102,7	102,9	96,3	63,6	68,3	53,4	59,4
SUM159	乳腺	84,7	90,8	54,1	58,5	20,7	25,2	16,4	19,2
Jurkat	T 淋巴瘤	26,8	26,4	3,7	4,1	2,6	9,7	4,1	1,6
Daudi	Burkitt's 淋巴瘤	17,3	9,7	6,2	5,0	7,2	5,3	6,0	6,1

[0424] 8.mAb1在植入人AML细胞系的小鼠模型中改进V γ 9V δ 2T细胞疗法

[0425] 由于mAb1靶标BTN3A在啮齿动物中不表达,并且V γ 9V δ 2T细胞亚群对灵长类动物具有特异性,V γ 9V δ 2 T细胞抗肿瘤活性概念的实验证明通常在免疫受损的NSG小鼠中进行测试,该小鼠植入了表达BTN3A的人肿瘤细胞系,并与来自健康人类供体的V γ 9V δ 2T细胞过继转移(该重构中的V γ 9V δ 2T细胞与肿瘤细胞系同种异体)。这些模型已被广泛用于验证V γ 9V δ 2T细胞在多种固体以及血液系统恶性肿瘤中的抗肿瘤治疗潜力(Pauza,C.D.等,2018,Immunol.9)。

[0426] 此外,还说明了向已接受人V γ 9V δ 2T细胞的小鼠施用的鼠抗人BTN3A抗体m20.1可以提高动物存活率,并减轻携带AML的NSG小鼠血液和骨髓中的白血病负担(benjamin等,2016,见上文)。在该模型中,将m20.1与RLI(rHuIL-15/IL-15R α 融合蛋白,该融合蛋白显示可扩增抗肿瘤淋巴细胞亚群并改进其在小鼠中的存活率)联合注射,从而获得转移的人V γ 9V δ 2T细胞的更好的抗肿瘤活性。

[0427] 为了进一步表征mAb1在小鼠体内模型中的功效,我们研究了人V γ 9V δ 2T细胞转移与mAb1结合以延迟肿瘤生长并改进携带AML的NSG小鼠的动物存活率的潜力。

[0428] a.U937模型

[0429] 如Gertner-Dardenne,J等,J.Immunol.188,4701-4708中所述,健康的6-8周龄的雌性小鼠(n=30)在第0天接受了 0.2×10^6 荧光素酶转导的U937细胞。在第1天,使用生物荧光成像评估肿瘤负荷,并将小鼠随机分为6组,以在第1天接受单独、或与抗BTN3A mAb1或相关同种型对照联合的静脉内注射体外消耗性人V γ 9V δ 2 T细胞(10mg/kg,200ug/小鼠)。在

第7天重复治疗。在第2组和第4组中,还在第4和第10天施用抗体。由于rHuIL-15/rHuIL15-R α 复合物可使V γ 9V δ 2T细胞增殖(J. Immunol. (2006) 177, 6072-608),这些复合物与V γ 9V δ 2T细胞一起施用。

[0430] 所有组描述于表16中。

[0431] 在注射(每只小鼠0.2ug hIL-15+1.2ug IL-15R-Fc)前,将hIL-15/IL-15R-Fc复合物在室温(RT)下预复合30分钟,并在注射前,与V γ 9V δ 2T细胞混合。每次注射的最终体积为100 μ l。在V γ 9V δ 2 T细胞植入前4小时注射治疗mAb。

[0432] 我们的结果证实,V γ 9V δ 2 T细胞和rHuIL-15/rHuIL15-R α 输注可减轻肿瘤负担。当将抗BTN3A mAb1与V γ 9V δ 2 T细胞一起添加时,这种作用更为显著,并且与存活率的显著提高有关(表16和表17)。

[0433] 重要的是,用于这种非常具有侵略性的小鼠模型(在带有U937肿瘤的NSG小鼠中为10mg/kg)的阿糖胞苷(Ara-C)(最有效的治疗急性髓样白血病的药物之一)可提高小鼠2-3天的存活率(约10%),如观察到的mAb1联合人V γ 9V δ 2 T细胞转移。

[0434] 这些数据突显了抗BTN3A mAb联合V γ 9V δ 2 T细胞免疫疗法在体内所发挥的有效抗白血病作用。

[0435] 表16:U937 AML小鼠模型:小组说明

组	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天
1	无	无	无	无
2	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +hIgG1 (10mg/kg)	hIgG1 (10mg/kg)	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +hIgG1 (10mg/kg)	hIgG1 (10mg/kg)
3	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +mAb1 (10mg/kg)	无	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +mAb1 (10mg/kg)	无
4	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +mAb1 (10mg/kg)	mAb1 (10mg/kg)	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +mAb1 (10mg/kg)	mAb1 (10mg/kg)
5	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +mIgG1 (10mg/kg)	无	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +mIgG1 (10mg/kg)	无
6	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +m20.1 (10mg/kg)	无	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) +IL-15a +m20.1 (10mg/kg)	无

[0437] a:rHu-IL-15/rHu-IL-15R α 复合物。

[0438] 表17:抗BTN3A(mAb1)活化mAb在AML异种移植模型中具有体内抗白血病活性。U937模型生物发光数据。

[0439]

	小鼠	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 19 天
第 1 组 PBS	1	1.10E+03	8.33E+04	1.06E+07	死亡
	2	7.04E+03	2.50E+05	6.14E+07	死亡
	3	7.57E+03	8.40E+04	2.41E+07	死亡
	4	9.23E+03	2.55E+05	6.48E+07	死亡
	5	1.37E+04	1.36E+05	3.58E+07	死亡
	平均值	7.73E+03	1.62E+05	3.93E+07	NA
第 2 组 LT γ δ + hIgG1 (第 1, 4, 7, 10 天)	1	3.24E+03	1.48E+04	5.23E+06	1.82E+08
	2	5.61E+03	1.39E+05	3.23E+07	死亡
	3	8.76E+03	3.44E+04	1.60E+07	2.23E+08
	4	9.87E+03	2.61E+04	1.66E+07	死亡
	5	1.03E+04	2.90E+05	3.14E+07	3.19E+08
	平均值	7.56E+03	1.01E+05	2.03E+07	NA
第 3 组 LT γ δ + mAb1 (第 1, 7 天)	1	3.38E+03	5.38E+03	1.89E+06	1.87E+08
	2	5.22E+03	3.68E+04	3.95E+06	2.04E+08
	3	7.49E+03	8.44E+04	1.23E+07	1.05E+08
	4	7.73E+03	6.67E+04	4.93E+06	1.79E+08
	5	1.29E+04	1.55E+04	5.32E+06	8.47E+07
	平均值	7.34E+03	4.18E+04	5.68E+06	1.52E+08
第 4 组 LT γ δ + mAb1 (第 1, 4, 7, 10 天)	1	4.08E+03	1.32E+03	2.14E+06	8.98E+07
	2	5.17E+03	7.58E+04	1.55E+06	1.79E+08
	3	9.21E+03	2.82E+04	6.82E+06	1.24E+08
	4	8.97E+03	4.00E+04	6.38E+06	1.91E+08
	5	1.00E+04	4.02E+04	3.65E+06	9.26E+07
	平均值	7.49E+03	3.71E+04	4.11E+06	1.35E+08
第 5 组 LT γ δ + mIgG1 (第 1, 7 天)	1	4.15E+03	4.01E+04	2.96E+06	1.19E+08
	2	4.53E+03	7.96E+04	4.91E+06	2.40E+08
	3	9.72E+03	1.66E+05	1.46E+07	2.97E+08
	4	8.92E+03	6.36E+04	1.35E+07	1.47E+08
	5	1.02E+04	3.97E+04	1.39E+07	1.91E+08
	平均值	7.50E+03	7.78E+04	9.97E+06	1.99E+08
第 6 组 LT γ δ + m20.1 (第 1, 7 天)	1	4.34E+03	8.51E+04	3.55E+06	1.57E+08
	2	4.42E+03	3.05E+04	4.28E+06	1.87E+08
	3	8.66E+03	6.62E+04	4.24E+06	5.55E+07
	4	8.90E+03	3.05E+04	2.49E+06	7.32E+07
	5	1.17E+04	1.62E+04	1.73E+06	9.61E+07
	平均值	7.60E+03	4.57E+04	3.26E+06	1.14E+08

[0440] 表18:抗BTN3A (mAb1) 活化mAb在AML异种移植模型中具有体内抗白血病活性。U937 细胞系植入后的存活率。

[0441]

	小鼠	死亡时间/天		小鼠	死亡日
第 1 组	1	18	第 4 组	1	20

[0442]	PBS	2	18	LT γ δ + mAb1 (第 1, 4, 7, 10 天)	2	22
		3	19		3	23
		4	19		4	23
		5	19		5	24
	中位数		19		中位数	23
	第 2 组 LT γ δ + hIgG1 (第 1, 4, 7, 10 天)	1	20	第 5 组 LT γ δ + mIgG1 (第 1, 7 天)	1	20
		2	20		2	20
		3	21		3	21
		4	21		4	21
		5	22		5	22
	中位数		21		中位数	21
	第 3 组 LT γ δ + mAb1 (第 1, 7 天)	1	21	第 6 组 LT γ δ + m20.1 (第 1, 7 天)	1	23
		2	21		2	24
		3	22		3	24
		4	24		4	24
		5	24		5	24
	中位数		22		中位数	24

[0443] b.MOLM14模型

[0444] 在异种移植模型中,使用移植了人肿瘤细胞系和人V γ 9V δ 2 T细胞的NSG小鼠评估mAb1对MOLM14(耐AraC的人AML衍生的细胞系)的体内功效。这项研究的目的是证实反复静脉注射人V γ 9V δ 2 T细胞与mAb1联合对肿瘤生长和小鼠存活率的影响。

[0445] 在第0天通过尾静脉向6-8周龄的雌性NSG小鼠静脉内(iv)以100 μ l体积的表达荧光素酶(luc2)的MOLM14(CVCL_7916)细胞注射, 0.2×10^6 细胞/每只小鼠。添加无内毒素的荧光素(30mg/kg)后,在第0天用PhotonIMAGER(生物空间实验室)进行生物荧光分析,并基于生物荧光信号的强度将小鼠随机分为7只小鼠的同组。在第1、8、15、22和29天静脉注射 3×10^6 个人体外扩增的V γ 9V δ 2T细胞和hIL-15/IL-15R复合物。在第1、5、8、12、15、19、22、26和29天静脉注射mAb1或hIgG1。

[0446] 不同的实验组总结于表19中。

[0447] 在注射(每只小鼠0.2ug hIL-15+1.2ug IL-15R-Fc)前,将hIL-15/IL-15R-Fc复合物在室温(RT)下预先复合30分钟,并在注射前,与V γ 9V δ 2T细胞混合。每次注射的最终体积为100 μ l。在V γ 9V δ 2T细胞植入前4小时注射治疗mAb。

[0448] 在细胞注射后第0、7、14、21和28天测量MOLM14细胞发射的生物荧光信号,以追踪肿瘤的生长。在第19天进行血液采样,通过流式细胞仪评估循环的MOLM14细胞的数量。在染色之前进行红细胞裂解。从分析中排除mCD45+鼠细胞,通过其GFP表达检测MOLM14肿瘤细胞。在LSRII SORP细胞仪(Becton Dickinson)上进行采集,并使用FlowJo软件进行分析。每天监测小鼠的疾病症状(体重明显减轻、毛皮褶皱、驼背、虚弱和活动能力降低),确定有痛苦迹象的已注射动物的杀伤时间。

[0449] 如表20所示,注射无关的对照同型(hIgG1)的V γ 9V δ 2T细胞不能显著地控制肿瘤的生长。相反,如较低的生物荧光信号所示,当将抗BTN3A mAb1顺次与人V γ 9V δ 2T细胞一起施用,肿瘤的生长会强烈地降低。结果还显示,在方案的第19天,循环母细胞的数量(通过外周血中的流式细胞仪评估)显著减少(表20)。重要的是,抗BTN3A mAb依赖性的肿瘤生长下降导致小鼠存活率显著提高了45%(与相应的同型对照相比)(表22)。

[0450] 表19:MOLM14小鼠模型:小组说明

组	动物数量	在第 7 和 14 天处理
1	6	PBS
2	7	V γ 9V δ 2 T 细胞(3×10^6 细胞) + IL15/IL15R-Fc + hIgG1 (10mg/kg)
3	7	V γ 9V δ 2 T 细胞 (3×10^6 细胞) + IL15/IL15R-Fc + mAb1 (10mg/kg)

[0452] 表20:MOLM14小鼠模型:肿瘤细胞植入后第0、7、14、21和28天生物荧光测量

	小鼠	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
第 1 组 PBS	1	5.1E+03	3.1E+04	1.1E+06	8.0E+06	死亡
	2	1.4E+04	1.1E+04	2.5E+05	2.2E+06	死亡
	3	8.0E+03	3.1E+04	1.6E+06	8.8E+06	死亡
	4	7.2E+03	2.5E+04	7.4E+05	2.6E+06	死亡
	5	7.7E+03	1.6E+04	4.5E+05	1.6E+06	死亡
	6	4.0E+03	2.5E+04	1.6E+06	1.5E+07	2.4E+07
	平均值	7.59E+03 3	2.32E+04 4	9.57E+05 5	6.36E+06 6	NA
第 2 组 LT γ δ + hIgG1	1	9.5E+03	2.0E+04	7.4E+05	4.0E+06	1.0E+07
	2	1.3E+04	5.6E+03	5.9E+05	3.1E+06	死亡
	3	7.7E+03	1.4E+04	6.0E+05	2.7E+06	死亡
	4	3.1E+03	4.5E+03	1.6E+05	5.6E+06	7.4E+06
	5	1.0E+04	1.2E+04	4.7E+05	5.5E+06	1.3E+07
	6	6.4E+03	3.1E+04	7.2E+05	2.8E+06	死亡
	7	8.8E+03	3.8E+03	2.1E+05	1.3E+06	5.4E+06
	平均值	8.45E+03 3	1.29E+04 4	4.97E+05 5	3.59E+06 6	NA
第 3 组 LT γ δ + mAb1	1	1.2E+04	3.0E+03	1.1E+04	8.6E+04	1.4E+06
	2	3.9E+03	2.0E+03	2.0E+04	2.3E+04	2.0E+05
	3	1.1E+04	3.4E+03	1.2E+05	2.6E+05	2.0E+06
	4	1.2E+04	2.6E+03	7.0E+03	1.7E+04	1.5E+05
	5	5.7E+03	1.9E+03	1.4E+04	1.0E+05	5.2E+05
	6	4.6E+03	1.3E+03	1.8E+04	2.6E+05	3.5E+06
	7	5.1E+03	1.3E+03	1.2E+04	1.2E+05	2.2E+05
	平均值	7.76E+03 3	2.19E+03 3	2.88E+04 4	1.24E+05 5	1.13E+06 6

[0455] 表21:MOLM14小鼠模型:方案第19天的循环胚细胞数量。数据代表每u1血液的细胞数量。

[0456]

	小鼠	第 19 天
第 1 组 PBS	1	6.1
	2	3
	3	4.2
	4	7.1
	5	1.7
	6	13.1
第 2 组 LT$\gamma$$\delta$+ hIgG1	1	1.2
	2	1.1
	3	3.3
	4	1.3
	5	4
	6	0.9

[0457]

	7	0.5
第 3 组 LT$\gamma$$\delta$+ mAb1	1	0
	2	0
	3	0.02
	4	0
	5	0
	6	0.02
	7	0

[0458] 表22:MOLM14小鼠模型:动物存活率。标出了每只动物的死亡日以及每组的存活率中位数。

[0459]

	小鼠	死亡日
第 1 组 PBS	1	23
	2	26
	3	27
	4	27
	5	28
	6	31
	中位数	27
第 2 组 LT$\gamma$$\delta$+ hIgG1	1	27
	2	27
	3	27
	4	29
	5	30
	6	30
	7	31
	中位数	29
第 3 组 LT$\gamma$$\delta$+ mAb1	1	39
	2	40
	3	41
	4	42
	5	43
	6	43
	7	46
	中位数	42

[0460] 9.mAb1在植入了人卵巢癌细胞系SKOV-3的小鼠实体瘤模型中改进V γ 9V δ 2 T细胞疗法

[0461] a.材料与方法

[0462] V γ 9V δ 2 T细胞体外扩增

[0463] 由从Etablissement **Français** du Sang (EFS,Nantes,France) 提供的健康供体血液样本并在Ficoll密度离心 (Eurobio,Les Ulis,France) 后获得的外周血单核细胞(PBMC) 扩增出同种异体的人V γ 9V δ 2T淋巴细胞。首先,为了使外周同种异体人V γ 9V δ 2 T淋巴细胞特异性扩增,将PBMC与3 μ M溴代磷酸焦磷酸(BrHPP) (由Innate Pharma (Marseille,France) 提供) 在添加10%热灭活的胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、10mg/mL链霉素、100IU/mL青霉素(均来自Gibco) 和100IU/mL重组人IL-2 (PROLEUKIN,Novartis,Bale,Suisse) 的RPMI培养基中孵育。4天后,向培养物补充300IU/mL IL-2。在第21天,通过流式细胞仪测量纯度(纯度>90%)。使用饲养细胞(和35Gy辐射的Epstein Barr病毒转化的B淋巴细胞和PBMC混合) 和PHA-L在补加了10%热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、10mg/mL链霉素,100IU/mL青霉素(均来自Gibco) 和300IU/mL重组人IL-2(Novartis) 的RPMI培养基中进一步扩增纯化的人V γ 9V δ 2T淋巴细胞。三周后,将静息的离体扩增V γ 9V δ 2 T淋巴细胞用于体内实验。

[0464] 小鼠模型

[0465] 在第0天,向6-8周龄的NSG小鼠腹膜内(ip) 注射 1×10^6 个表达荧光素酶的SKOV-3

细胞(卵巢癌细胞系,SKOV-3-luc-D3,Perkin Elmer,Waltham,MA),每只小鼠注射100μL体积的无菌PBS。7天后,将小鼠随机分为5至6只小鼠的同组。在第7天和第14天,将mAb处理组(每只小鼠200μg的mAb1或相关同型对照(hIgG1))腹膜内注射100μL无菌PBS。4小时后,还将每只小鼠腹膜内注射100μL无菌PBS中的 5×10^6 个体外扩增的人V γ 9Vδ2T细胞。

[0466] 在肿瘤细胞植入后第16、23和30天测量SKOV-3细胞发射的生物荧光信号以追踪肿瘤的生长。在用2%异氟烷麻醉的小鼠腹膜内注射1.5mg D-荧光素(Interchim,San Diego,CA)8分钟后,用Biospace Im-ager(Biospace Lab,Nesles-la-Vallée,France)实现了生物荧光成像。当小鼠失去其初始重量的10%时,达到实验终点。

[0467] b.结果

[0468] 在异种移植模型中,使用移植了人卵巢癌细胞系SKOV-3和人V γ 9Vδ2 T细胞的NSG小鼠评估mAb1对抗卵巢癌的体内功效。这项研究的目的是评估两次静脉注射人V γ 9Vδ2 T细胞联合mAb1对肿瘤生长和小鼠存活率的影响。

[0469] 在第0天向腹膜内(ip)向NSG小鼠注射SKOV3。7天后,根据处理将小鼠随机分为同组。这些组描述于表23中:

[0470] 表23:卵巢癌小鼠模型:小组说明

[0471]	组 动物数量 在第 7 和 14 天的处理		
	1	5	PBS
	2	6	Vγ9Vδ2 T 细胞(5×10^6 细胞) +hIgG1 (10mg/kg)
	3	6	Vγ9Vδ2 T 细胞(5×10^6 细胞) +mAb1 (10mg/kg)

[0472] 结果表明,与mAb1一起转移的人V γ 9Vδ2 T细胞显著延迟了肿瘤生长(表24),从而使使得动物存活率显著提高(表25)。值得注意的是,在不存在前V γ 9Vδ2T存活细胞因子(诸如IL-2或IL-15)的情况下,观察到了这种作用。

[0473] 表24:卵巢癌小鼠模型:肿瘤细胞植入后第16、23和30天生物荧光测量

[0474]	小鼠 第 16 天 第 23 天 第 30 天				
	第 1 组 PBS	1	87220	死亡	死亡
		2	48486	92643	死亡
		3	89032	89930	死亡
		4	74242	121010	死亡
		5	82132	128390	死亡
		平均值	7.62E+04	1.08E+05	NA
	第 2 组 LTγδ+ hIgG1	1	32060	70953	死亡
		2	82703	166009	死亡
		3	23049	51909	150537
		4	85130	147390	死亡
		5	18053	45097	死亡
		6	41732	76461	死亡

[0475]	第 3 组 LT$\gamma$$\delta$+ mAb1	平均值	4.71E+04	9.30E+04	NA
		1	43000	42420	80574
		2	20706	43670	63418
		3	6891	47150	70070
		4	11845	48139	36820
		5	22958	29131	74111
		6	12725	19767	死亡
		平均值	1.97E+04	3.84E+04	6.50E+04

[0476] 表25:卵巢癌小鼠模型:动物存活率。列出了每只动物的死亡日以及每组的存活率中位数。

[0477]	第 1 组 PBS	小鼠	死亡日
		1	20
		2	23
		3	23
		4	23
		5	28
	中位数		23
	第 2 组 LT$\gamma$$\delta$+ hIgG1	1	23
		2	23
		3	28
		4	28
		5	28
		6	35
	中位数		28
	第 3 组 LT$\gamma$$\delta$+ mAb1	1	28
		2	35
		3	35
		4	35
		5	35
		6	39
	中位数		35

[0478] 10. 食蟹猴V γ 9V δ 2 T细胞的体内作用

[0479] 由于啮齿动物中不存在BTN3A和V γ 9V δ 2 T亚群,并且基于先前记录的食蟹猴体内和体外PAg介导的V γ 9V δ 2 T细胞活化的数据,食蟹猴(Macaca fascicularis)被选择用于mAb1的非临床安全性评估的唯一相关物种。

[0480] a. 材料与方法

[0481] Biacore

[0482] 使用Biacore T200(serial no.1909913)仪器经由Biacore多周期动力学分析,评估了mAb1与重组人或食蟹猴BTN3A1、BTN3A2和BTN3A3蛋白(分别为SEQ ID NO 21、22和23)的结合。在2%的BSA/PBS中将mAb1稀释至浓度2 μ g/ml。在每个周期开始时,抗体以约150RU的密度(RL)(获得的理论值RMax约50RU)被捕获在Protein A表面。捕获后,在注射BTN3A抗

原之前使表面稳定。BTN3A在0.1%BSA/HBS-P+ (运行缓冲液) 中以25-0.78nM的范围内两倍稀释进行滴度测定。监测结合阶段420秒,解离阶段2000秒。使用50 μ l/min的流速获得动力学数据,以最小化任何潜在的传质影响。使用1:1结合模型拟合获得的数据。

[0483] ELISA

[0484] 通过ELISA测试了mAb1对人和食蟹猴BTN3A1的表观亲和力。简而言之,使用在磷酸盐缓冲液(1 $\times$ PBS)中以1 μ g/ml固定在板上的重组BTN3A1评估mAb1与靶标的结合,然后用封闭缓冲液(2%奶/PBS)进行饱和。在封闭缓冲液中以0.00122-20 μ g/ml的四倍稀释度滴定mAb1。使用二抗(山羊抗人Ig κ 链、HRP缀合抗体,Millipore AP502P,在封闭液中按1:4000稀释)和TMB溶液进行检测。表观亲和力表示为EC50% (获得50%信号平稳所需的抗体浓度)。

[0485] mAb1与人和食蟹猴CD3+细胞的结合亲和力

[0486] 红细胞裂解后,将人或食蟹猴PBL与浓度递增的mAb1或同型对照在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,洗涤两次,并用山羊抗人IgG-PE缀合的二抗(eBioscienceTM#12-4998-82)染色。洗涤2次后,将细胞用抗CD3-PC3 mAb (BD Bioscience#557749) 和Live/Dead试剂(Life Technology#L10119)染色。洗涤后,将细胞重悬于200 μ L流动缓冲液中。然后,在Cytotflex细胞仪(Beckman Coulter)上分析细胞。使用FlowJo软件(Version 10,FlowJo,LLC,Ashland,USA)对活CD3+种群进行门控数据分析。然后,计算来自PE通道的MFI值,并对浓度作图。使用GraphPad Prism软件的Sigmoidal 4PL方程获得曲线拟合。

[0487] BTN3A在人和食蟹猴循环细胞的表面表达

[0488] 对于BTN3A在白细胞的表面表达,将100 μ l食蟹猴和人全血接种在96孔板中,并用特异性抗体混合物(Aqua live Dead试剂、CD20-V450、CD8-BV605、CD4-BV650、Vg9 TCR-FITC、抗-BTN3A-PE(clone 20.1) (或用于同型对照的mIgG1-PE)、CD3-PeCy7、CD45-AF700和CD14-APC-H7),在避光条件下于室温孵育15分钟。然后,根据制造商的操作说明,用900 μ l的裂解试剂(BD Bioscience#349202)裂解红细胞。洗涤细胞并使用多参数流式细胞仪进行分析。对于BTN3A在红细胞和血小板上的表面表达,将100 μ l食蟹猴或人全血用100 μ l PBS稀释并与特定的抗体混合物(Aqua live dead、CD41-APC、CD45-AF700和抗BTN3A(clone 20.1) (或用于同型对照的mIgG1-PE))在室温下避光保存15分钟。洗涤后,使用多参数流式细胞仪分析细胞。为了获得BTN3A表面表达的相对量,根据制造商的操作说明,平行使用了校准珠(CellQuant Calibrator Biocytex#7208)和山羊抗小鼠IgG(H+L)-PE。对于每个细胞亚群,PE通道的MFI被报道用于抗BTN3A和同型对照。通过从抗BTN3A染色的MFI中减去同型对照的MFI进行分析,并基于用校准珠获得的标准曲线计算相对表面表达。

[0489] 食蟹猴V γ 9V δ 2 T细胞的体外扩增和活化

[0490] 用红血裂解缓冲液处理来自3只动物的食蟹猴全血。大量洗涤后,在rHuIL-2 (200IU/ml)和mAb1 (10 μ g/ml)存在下,将白细胞以1.5M/ml RPMI 10%SVF接种在6孔板中。在第6天和第8天添加rHuIL-2,以模拟用于人PBMC的常规细胞扩增方案,并改进V γ 9V δ 2 T细胞的长期体外存活率,以获得足够数量的细胞来进行功能分析。在第0、6、8和10天使用特异性抗体混合物和流式细胞仪分析评估了V γ 9+T细胞的百分比(CD3-PC7 BD Bioscience#557749、Vg9 TCR-FITC clone 7A5 Invi-trogen#TCR2720、Live Dead Near IR ThermoFisher#L10119)。

[0491] 在第10天,计数扩增的V γ 9V δ 2T细胞,并与人肿瘤细胞系以1:1的E:T比例共培养。

在96孔板中,在mAb1或hIgG1同型对照(10ug/ml)或PM(20ng/ml) A/离子霉素(1ug/ml)用作阳性对照的情况下,将100 000个靶肿瘤细胞系(Raji、DAUDI和K562)与100 000食蟹猴V γ 9V82 T细胞混合。4小时后,使用CD107a/b(BD biosci-ence#555800)染色和流式细胞仪分析监测V γ 9V82T细胞脱粒。

[0492] 食蟹猴体内研究

[0493] 活体研究

[0494] 在这项研究中,使用了4-6岁龄,3-5公斤的越南食蟹猴(Macaca fascicularis)。所有动物均按照GLP动物设施中机构动物护理和使用委员会的指导进行饲养和使用。作为饲养员的健康程序,对所有动物进行了结核病检测,并在饲养员的记录中记录了预防措施。到达后,使动物适应研究程序至少2周。进行了健康检查和测试的临床检查。在给药前阶段开始之前,兽医进行了动物健康评估,以确认每只动物是否适合研究。

[0495] 在对未禁食动物的皮肤进行消毒后,静脉内(座椅固定,在15分钟内输注)施用mAb1。第1、4和5组的动物在第1、8、15和22天给药。第2和3组的动物在第1天给药一次。

[0496] 药代动力学

[0497] 开发了一种合格的药代动力学测定法,用于定量食蟹猴血清中的mAb1。简而言之,使用ELISA通过分光光度法对mAb1进行定量。链霉亲和素预包被的板用于捕获人IgG-Fc PK生物素缀合物。然后,将mAb1捕获在板表面上,并使用山羊抗人IgG-HRP(Fc特异性)抗体(一种过氧化物酶标记的抗物种抗体)检测结合的分析物。在纯血清中定量的目标范围是90ng/mL-10000ng/mL。

[0498] 免疫表型

[0499] 从所有动物的头脑腔静脉或盲肠腔抽取血样(1.0mL)至肝素锂(Li-Heparin)管中。用特异性单克隆抗体混合物进行免疫分型。进行相对细胞数(淋巴细胞/白细胞的百分比)的分析。在同一天通过血液分析仪确定总的粒细胞/淋巴细胞/白细胞计数,并用于计算绝对数。从相对数计算淋巴细胞亚群的绝对数。

[0500] 受体占用率

[0501] 从所有动物的头脑腔静脉或盲肠腔抽取血样(400 μ L)至肝素锂(Li-Heparin)管中。与细胞上的BTN3A(clone 103.2)非竞争性结合的标记抗体(已与过量的ICT01预孵育)用于确定CD3+T细胞和CD19+B细胞上总的表面BTN3A表达。为检测游离的BTN3A结合位点,使用未标记的mAb1与BTN3A的竞争性结合,该竞争性结合抑制了荧光染料标记的抗BTN3A抗体(mAb1)在CD3+T细胞和CD19+B细胞上的结合。取决于被mAb1阻断的BTN3A的量,缀合mAb1的平均荧光强度(MFI)随着几何平均值的降低而测量。因此,接近同型抗体的Ab7.2的染色强度指示完全饱和。

[0502] b. 结果

[0503] mAb1结合食蟹猴BTN3A.

[0504] 由于无法从公共数据库中鉴别3个BTN3A亚型基因,因此使用高度保守的接近跨膜结构域的cDNA序列来设计相关引物,ImCheck对从食蟹猴PBMC分离的cDNA进行了靶向PCR。PCR产物的测序允许鉴定食蟹猴BTN3A1、BTN3A2和BTN3A3的胞外域序列。基于这些序列(分别为SEQ ID NO 21、22和23),在CHO细胞中产生了与6 $\times$ His标签融合的食品蟹猴BTN3A1、BTN3A2和BTN3A3亚型的重组胞外域。

[0505] 通过BIAcore和ELISA测试重组蛋白的mAb1结合(表26)。BIAcore结果显示,尽管对BTN3A1亚型的亲和力较低,mAb1有利地与3个食蟹猴重组BTN3A1、BTN3A2和BTN3A3结合。ELISA在BTN3A1亚型上进行。令人关注的是,表26显示了mAb1结合重组人或食蟹猴BTN3A1的可比EC50。

[0506] 表26:mAb1结合人和食蟹猴BTN3A重组蛋白

[0507]	蛋白质	标记	K _D (M) - BIAcore (MCK)	EC ₅₀ (M) - ELISA
	人 BTN3A1 (Sino biological# 15973-H08H)	C-端 His	0.408E-9	0.93E-9
	食蟹猴 BTN3A1	C-端 His	83.8E-09	1.33E-9
	食蟹猴 BTN3A2	C-端 His	5.97E-09	nd
	食蟹猴 BTN3A3	C-端 His	2.67E-09	nd

[0508] nd:未确定

[0509] 平行地,通过流式细胞仪评估mAb1与食蟹猴PBMC的结合。与食蟹猴CD3+T细胞结合的mAb1的平均EC50与人CD3+T细胞的相当(表27)。使用PE缀合的抗BTN3A mAb(clone 20.1)和一组对人和食蟹猴细胞表面标志物具有已知交叉反应性的表型抗体,通过多参数流式细胞仪,进行了食蟹猴VS人类健康供体全血不同免疫细胞亚群上的靶标表达(数据未显示)。这些结果表明,尽管在食蟹猴中观察到明显的、通常较低的表达,但在两种物种中,BTN3A均在广泛的外周血细胞群体中的表达。

[0510] 表27:mAb1与人和食蟹猴CD3+T细胞结合

[0511]	细胞	来源	描述	门 控 (Gating)	EC ₅₀ (μg/mL) (+/-sem)	EC ₅₀ (x10 ⁻⁹ M) (+/-sem)
	人 HV PBMC	EFS Marseille	原代(n=6)	CD3+	5.25 (+/-0.57)	34.9 (+/-3.8)
	食蟹猴 PBMC	Covance Munster	原代(n=6)	CD3+	7.02 (+/-0.89)	46.79 (+/-5.94)

[0512] mAb1促进食蟹猴V γ 9Vδ2T细胞的体外扩增和活化

[0513] 接下来,评估mAb1在食蟹猴V γ 9Vδ2 T细胞上的体外功能活性。首先,我们评估了mAb1在与食蟹猴PBMC孵育10天后是否能促进食蟹猴V γ 9Vδ2 T细胞的扩增。如图4A所示,在测试的所有3只动物中,mAb1促进了V γ 9Vδ2 T细胞的扩增;该细胞种群在10天后达到60%,这一水平与人类细胞所观察到的水平相当。扩增10天后,在mAb1存在的情况下,将细胞与用作靶细胞的Daudi、K562或Raji细胞系共培养4小时,并通过流式细胞仪分析CD107a/b的表达。此实验表明,与所有3种肿瘤细胞系共培养时,mAb1会诱导显著的V γ 9Vδ2 T细胞活化(图4B)。

[0514] 总之,结果表明:(i)mAb1以与人细胞相似的亲和力与食蟹猴细胞结合,(ii)BTN3A在人和食蟹猴的相同血细胞上表达,尽管观察到后者的表达水平较低,(iii)mAb1促进食蟹猴PBMC中V γ 9Vδ2T细胞亚群的扩增,并且扩增的细胞对mAb1刺激的肿瘤靶细胞具有反应性。

[0515] mAb1在体内影响食蟹猴Vg9Vd2 T细胞区室

[0516] 在接受单次或重复静脉输注mAb1的4-6岁龄健康雌性食蟹猴中进行了体内研究

(表28)。

[0517] 选择静脉内施用途径是因为它是预期的人类治疗途径。根据逐步增加的剂量设计,用mAb1处理动物。

[0518] 表28:mAb1 PK/PD/耐受性研究设计

[0519]	组	测试项目	剂量 (mg/kg)	每周注射数量	动物数量和性别
	1	mAb1	0.1-1-10-100	4 (递增剂量)	1F (标记(sentinel)动物)
	2		1	1	3F
	3		10	1	2F
	4		10	4	2F
	5		100	4	2F

[0520] 评估了以下结果:临床体征、体重、临床病理(血液学、临床化学和凝血)、外周血白细胞群的免疫表型分析、活化/增殖/分化标志物、药代动力学和药效动力学(循环T和B细胞上的BTN3A受体占有率)。

[0521] 在接受单次或4次重复15分钟的mAb1输注后,所有动物均存活到研究的第29天的预定的解剖。在体重或食物消耗方面未发现与测试物相关的影响。临床体征与食蟹猴在实验室环境中观察到的观察结果一致,因此不能归因于测试物。

[0522] 药代动力学

[0523] 在0.1-100mg/kg的剂量范围的静脉内(IV)给药后,mAb1表现出近似剂量比例的药代动力学表现(数据未显示),并且在没有靶标介导的清除的情况下,表现出IgG mAb特有的较长的消除半衰期。在连续10或100mg/kg/周的4次重复给药(数据未显示)后,在整个治疗期间内所有动物均保持暴露,在4周的治疗期内只有极少的积累。在逐步增加的每周给药方案中,静脉注射1和10mg/kg剂量后,标记动物的药代动力学概况显示出一些证据,表明在每周给药间隔期结束时清除率增加,这可能是由于对mAb1形成ADA所致;在最后一次静脉给药100mg/kg后,没有证据表明清除率增加。

[0524] 受体占用率(R0)

[0525] 根据血液中BTN3A的表达情况和细胞数量表示,在CD3+T细胞和CD20+B细胞上测量mAb1 R0。

[0526] 结果表明,在mAb1注射后,BTN3A在CD3+T细胞和CD20+B细胞上均迅速占据(数据未显示)。在整个每周的给药间隔中,似乎都需要以100mg/kg mAb1的剂量进行重复给药才能达到完全的受体占用。

[0527] 免疫表型

[0528] 在每次给药后的选定时间点,接受mAb1的动物血液用特定mAb混合物染色,以定量T细胞亚群(CD4、CD8、V γ 9T细胞、调节性T细胞)、B细胞、单核细胞、NK细胞、mDC、pDC和粒细胞以及相关的活化标志物(CD69、CD86、CD95、粒酶B、Ki67),并通过流式细胞仪进行分析。分析包括每个群体的相对细胞数(淋巴细胞/白细胞百分比),以及从同时采集并通过血液细胞计数器分析的血液样本确定的总淋巴细胞/白细胞计数推断出的绝对细胞数。

[0529] 这项广泛研究的主要观察结果是:

[0530] 在所有接受mAb1的动物中,给药后V δ 9+T细胞(CD3+中的百分比)均显著下降,并在单剂量动物中逐渐恢复。这种作用似乎是特异性的,因为在CD4和CD8 $\alpha\beta$ T细胞中未观察到,启示了 $\gamma\delta$ T细胞的活化和组织上的边缘化,正如在食蟹猴和人对CD3衔接子双特异性抗体观察到的那样(Smith等,2015 Sci Rep.2015 Dec 11;5:17943.Doi:10.1038/srep17943)。结果如图5所示。

[0531] 这项研究表明,通过静脉内途径施用,时,mAb1在最高100mg/kg/周的剂量下似乎具有良好的耐受性。此外,在T细胞亚群中,V γ 9V δ 2T细胞特异性地且显著地受到mAb1的影响。

[0532] 参考文献:

[0533] Alegre,M.-L.,Frauwirth,K.A.,and Thompson,C.B. (2001).T-cell regulation by CD28 and CTLA-4.Nat.Rev.Immunol.1,220-228.

[0534] Ausubel,F.M.,Brent,R.,Kingston,R.E.,Moore,D.D.,Seidman,J.G.,and Struhl,K. (1988).Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons).

[0535] Baudino,L.,Shinohara,Y.,Nimmerjahn,F.,Furukawa,J.-I.,Nakata,M.,Martínez-Soria,E.,Petry,F.,Ravetch,J.V.,Nishimura,S.-I.,and Izui,S. (2008).Crucial Role of Aspartic Acid at Position 265 in the CH2 Domain for Murine IgG2a and IgG2b Fc-Associated Effector Functions.J.Immunol.181,6664-6669.

[0536] Bensussan,A.,and Olive,D. (2005).T-cell:Section report.Cell.Immunol.236,3-5.

[0537] Bird,R.E.,Hardman,K.D.,Jacobson,J.W.,Johnson,S.,Kaufman,B.M.,Lee,S.M.,Lee,T.,Pope,S.H.,Riordan,G.S.,and Whitlow,M. (1988).Single-chain antigen-binding proteins.Sci-ence 242,423-426.

[0538] Brennan,M.,Davison,P.F.,and Paulus,H. (1985).Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments.Science 229,81-83.

[0539] Bryson,C.J.,Jones,T.D.,and Baker,M.P. (2010).Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins.BioDrugs 24,1-8.

[0540] Chapoval,A.I.,Ni,J.,Lau,J.S.,Wilcox,R.A.,Flies,D.B.,Liu,D.,Dong,H.,Sica,G.L.,Zhu,G.,Tamada,K.,et al. (2001).B7-H3:A costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production.Nat.Immunol.2,269-274.

[0541] Collins,M.,Ling,V.,and Carreno,B.M. (2005).The B7 family of immune-regulatory ligands.Genome Biol.6,223.

[0542] Coyle,A.J.,and Gutierrez-Ramos,J.C. (2001).The expanding B7 superfamily:increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function.Nat.Immunol.2,203-209.

[0543] Dong,H.,Zhu,G.,Tamada,K.,and Chen,L. (1999).B7-H1,a third member of the B7 family,co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10secretion.Nat.Med.5,1365-1369.

[0544] Freeman,G.J.,Long,A.J.,Iwai,Y.,Bourque,K.,Chernova,T.,Nishimura,H.,Fitz,L.J.,Mal-enkovich,N.,Okazaki,T.,Byrne,M.C.,et al. (2000).Engagement of

the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034.

[0545] Glennie, M. J., McBride, H. M., Worth, A. T., and Stevenson, G. T. (1987). Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J. Immunol.* 139, 2367-2375.

[0546] Goeddel, D. V. (1990). [1] Systems for heterologous gene expression. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 3-7.

[0547] Gu, S., Nawrocka, W., and Adams, E. J. (2015). Sensing of Pyrophosphate Metabolites by γ 9V δ 2 T Cells. *Front. Immunol.* 5.

[0548] Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.-M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E. J., Netzer, S., et al. (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human γ δ T-cell subset. *Blood* 120, 2269-2279.

[0549] Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., and Crea, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5879-5883.

[0550] Kabat, E. A., Wu, T. T., Foeller, C., Perry, H. M., and Gottesman, K. S. (1992). *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (DIANE Publishing).

[0551] Karpovsky, B., Titus, J. A., Stephany, D. A., and Segal, D. M. (1984). Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J. Exp. Med.* 160, 1686-1701.

[0552] Kaufman, R. J., and Sharp, P. A. (1982). Construction of a modular dihydrofolate reductase cDNA gene: analysis of signals utilized for efficient expression. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1304-1319.

[0553] Khattri, R., Auger, J. A., Griffin, M. D., Sharpe, A. H., and Bluestone, J. A. (1999). Lymphoproliferative Disorder in CTLA-4 Knockout Mice Is Characterized by CD28-Regulated Activation of Th2 Responses. *J. Immunol.* 162, 5784-5791.

[0554] Klocke, K., Sakaguchi, S., Holmdahl, R., and Wing, K. (2016). Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E2383-E2392.

[0555] Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261-268.

[0556] Linsley, P. S., Greene, J. L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., Anasetti, C., and Damle, N. K. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176, 1595-1604.

- [0557] Liu, M.A., Kranz, D.M., Kurnick, J.T., Boyle, L.A., Levy, R., and Eisen, H.N. (1985). Hetero-antibody duplexes target cells for lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 8648-8652.
- [0558] McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- [0559] Morrison, S.L. (1985). Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science* 229, 1202-1207.
- [0560] Ni, L., and Dong, C. (2017). New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol. Cancer Ther.* 16, 1203-1211.
- [0561] Oganesyan, V., Gao, C., Shirinian, L., Wu, H., and Dall'Acqua, W.F. (2008). Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64, 700-704.
- [0562] Panowski, S., Bhakta, S., Raab, H., Polakis, P., and Junutula, J.R. (2013). Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs* 6, 34-45.
- [0563] Paulus, H. (1985). Preparation and biomedical applications of bispecific antibodies. *Behring Inst. Mitt.* 118-132.
- [0564] Perry, L.C.A., Jones, T.D., and Baker, M.P. (2008). New approaches to prediction of immune responses to therapeutic proteins during preclinical development. *Drugs* 9, 385-396.
- [0565] Reddy, M.P., Kinney, C.A.S., Chaikin, M.A., Payne, A., Fishman-Lobell, J., Tsui, P., Monte, P.R.D., Doyle, M.L., Brigham-Burke, M.R., Anderson, D., et al. (2000). Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4. *J. Immunol.* 164, 1925-1933.
- [0566] Remington, J.P., and Gennaro, A.R. (1995). *Remington: the science and practice of pharmacy* (Easton, PA: Mack Publishing).
- [0567] Rhodes, D.A., Stammers, M., Malcherek, G., Beck, S., and Trowsdale, J. (2001). The Cluster of BTN Genes in the Extended Major Histocompatibility Complex. *Genomics* 71, 351-362.
- [0568] Ruddy, D.A., Kronmal, G.S., Lee, V.K., Mintier, G.A., Quintana, L., Domingo, R., Meyer, N.C., Irrinki, A., McClelland, E.E., Fullan, A., et al. (1997). A 1.1-Mb Transcript Map of the Hereditary Hemochromatosis Locus. *Genome Res.* 7, 441-456.
- [0569] Saverino, D., Tenca, C., Zarcone, D., Merlo, A., Megiovanni, A.M., Valle, M.T., Manca, F., Grossi, C.E., and Ciccone, E. (1999). CTLA-4 (CD152) Inhibits the Specific Lysis Mediated by Human Cytolytic T Lymphocytes in a Clonally Distributed Fashion. *J. Immunol.* 162, 651-658.
- [0570] Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116-126.
- [0571] Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. (2018). The diverse functions of the PD1

inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 153-167.

[0572] Shukla, A.A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., and Low, D. (2007). Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *J. Chromatogr. B* 848, 28-39.

[0573] Stech, M., Nikolaeva, O., Thoring, L., **Stöcklein**, W.F.M., Wüstenhagen, D.A., Hust, M., Dübel, S., and Kubick, S. (2017). Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled in vitro transcription-translation system based on CHO cell lysates. *Sci. Rep.* 7, 12030.

[0574] Strohl, W.R. (2009). Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 685-691.

[0575] Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N. (1988). SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8, 466-472.

[0576] Tseng, S.-Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *J. Exp. Med.* 193, 839-846.

[0577] Urlaub, G., and Chasin, L.A. (1980). Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in di-hydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4216-4220.

[0578] Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381-405.

序列表

<110> 感应检查疗法公司 (IMCHECK THERAPEUTICS SAS)

<120> 抗 BTN3A 抗体及其在治疗癌症或感染性病症中的用途

<130> BEP180083 EP

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001]

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Glu Asp Asp Tyr Asp Gly Thr Pro Phe Ala Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

[0002]

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0003]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 4

<211> 451

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

[0004]

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Glu Asp Asp Tyr Asp Gly Thr Pro Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

[0005]

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

[0006] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly
450

<210> 5

<211> 448

[0007] <212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Glu Asp Asp Tyr Asp Gly Thr Pro Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140

[0008]

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

[0009]

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

[0010]

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

[0011] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0012]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

[0013]

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8

<211> 1356

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8	
caggccaac tggcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagttg	60
tctgcaagg ctctggcta catctcacc agatactata tgtattgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gcctlgagt gattggagag attaatccta acaatgggtg tactaagttc	180
aatgagaagt tcaagaacag ggccacactg actgtagaca aatccatcag cacagcatac	240
atggagctca gcaggctgag atctgacgac acggcggctct attattgttc aagagaggat	300
gattacgacg ggacccccctt tgctatggac tactgggggtc aaggaaccct ggtcaccgtc	360
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc	420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc tgcctacag	540
[0014] tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt	660
gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaattcgag	720
gggggaccgt cagtcttct ctcccccca aaaccaagg acacctcat gatctccgg	780
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcctccat cgagaaaacc	1020
atctccaaag ccaaaggga gccccagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatccgg	1080
gaagagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc	1140

	gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1200
	cccgctgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc	1260
	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1320
	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggttga	1356
	<210> 9	
	<211> 1347	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 9	
	caggccaac tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagtgc	60
[0015]	tcttgaagg ctcttggtc catcttcacc agatactata tgtattgggt gaagcagagg	120
	cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaactcta acaatggtgg tactaagttc	180
	aatgagaagt tcaagaacag ggccacactg actgtagaca aatccatcag cacagcatac	240
	atggagctca gcaggctgag atctgacgac acggcggctc attattgttc aagagaggat	300
	gattacgacg ggacccccct tgctatggac tactggggtc aaggaaccct ggtcaccgtc	360
	tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgccctgctc caggagcacc	420
	tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact actccccga accggtgacg	480
	gtgtcgtgga actcaggegc cctgaccagc ggcgtgcaca cctccccgc tgtctacag	540
	tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg	600
	aagacctaca cctgcaatgt agatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt	660

	gagtcctaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcga ggggggacca	720
	tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag	780
	gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	840
	gtggatggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgctc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	960
	tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa	1020
	gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacacctgc ccccatccca ggaggagatg	1080
	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctacccag cgacatcgcc	1140
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccgtgctg	1200
[0016]	gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag	1260
	gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	1320
	aagagcctct ccctgtctct ggggtga	1347
	<210> 10	
	<211> 645	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 10	
	gacatccaga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat ccgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc atgccagtc gaacattaat gtttggttat cttggtacca gcagaaacca	120
	ggaaaagccc ctaaactctt gatctataag gttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180
	agatttactg gcagtggatc tggaacagat ttacattca ccatcagcag cctgcagcct	240

gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccatacac gttcggacag 300

gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 11

<211> 645

<212> DNA

<213> 智人

[0017]

<400> 11

gacatccaga tgaccacgtc tccatccagt ctgtctgcat ccgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttat ctgtgtacca gcagaaacca 120

ggaaaagccc cttaaactctt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180

agatttagtg gcagtggatc tggaacagat ttcacattca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccatacac gttcggacag 300

gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Arg Tyr Tyr Met Tyr

1 5

[0018] <210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Glu Asp Asp Tyr Asp Gly Thr Pro Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

[0019] <210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 18

<211> 513

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Met Lys Met Ala Ser Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe Arg Val

1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Met Pro His Ser Ala Gln Phe Ser

20 25 30

Val Leu Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala

35 40 45

[0020]

Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu

50 55 60

Leu Lys Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg

100 105 110

Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe

115 120 125

Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Ser Asp Leu His Val Asp Val Lys Gly Tyr Lys Asp Gly
145 150 155 160

Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln
165 170 175

Ile Gln Trp Ser Asn Asn Lys Gly Glu Asn Ile Pro Thr Val Glu Ala
180 185 190

[0021] Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Ala Val Ala Ala Ser Val
195 200 205

Ile Met Arg Gly Ser Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Thr Ile Arg Ser
210 215 220

Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro
225 230 235 240

Phe Phe Arg Ser Ala Gln Arg Trp Ile Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu
245 250 255

Pro Val Leu Leu Leu Leu Leu Gly Gly Ala Gly Tyr Phe Leu Trp Gln
260 265 270

Gln Gln Glu Glu Lys Lys Thr Gln Phe Arg Lys Lys Lys Arg Glu Gln
275 280 285

Glu Leu Arg Glu Met Ala Trp Ser Thr Met Lys Gln Glu Gln Ser Thr
290 295 300

Arg Val Lys Leu Leu Glu Glu Leu Arg Trp Arg Ser Ile Gln Tyr Ala
305 310 315 320

Ser Arg Gly Glu Arg His Ser Ala Tyr Asn Glu Trp Lys Lys Ala Leu
325 330 335

Phe Lys Pro Ala Asp Val Ile Leu Asp Pro Lys Thr Ala Asn Pro Ile
340 345 350

[0022]

Leu Leu Val Ser Glu Asp Gln Arg Ser Val Gln Arg Ala Lys Glu Pro
355 360 365

Gln Asp Leu Pro Asp Asn Pro Glu Arg Phe Asn Trp His Tyr Cys Val
370 375 380

Leu Gly Cys Glu Ser Phe Ile Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu
385 390 395 400

Val Gly Asp Arg Lys Glu Trp His Ile Gly Val Cys Ser Lys Asn Val
405 410 415

Gln Arg Lys Gly Trp Val Lys Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Thr
420 425 430

Met Gly Leu Thr Asp Gly Asn Lys Tyr Arg Thr Leu Thr Glu Pro Arg
435 440 445

Thr Asn Leu Lys Leu Pro Lys Pro Pro Lys Lys Val Gly Val Phe Leu
450 455 460

Asp Tyr Glu Thr Gly Asp Ile Ser Phe Tyr Asn Ala Val Asp Gly Ser
465 470 475 480

His Ile His Thr Phe Leu Asp Val Ser Phe Ser Glu Ala Leu Tyr Pro
485 490 495

Val Phe Arg Ile Leu Thr Leu Glu Pro Thr Ala Leu Thr Ile Cys Pro
500 505 510

[0023]

Ala

<210> 19

<211> 334

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Met Lys Met Ala Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe His Val
1 5 10 15

Ser Leu Leu Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ser

20 25 30

Val Leu Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala

35 40 45

Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu

50 55 60

Leu Lys Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg

85 90 95

[0024]

Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg

100 105 110

Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe

115 120 125

Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Ser Asn Leu His Val Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly

145 150 155 160

Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln

165 170 175

Ile Gln Trp Ser Asn Ala Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala
180 185 190

Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Glu Val Ala Ala Ser Val
195 200 205

Ile Met Arg Gly Gly Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn
210 215 220

Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro
225 230 235 240

Phe Phe Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ile Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu
245 250 255

[0025]

Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Phe Leu Trp Arg
260 265 270

Gln Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ser Ser Glu Ile Glu Ser Glu Gln
275 280 285

Glu Met Lys Glu Met Gly Tyr Ala Ala Thr Glu Arg Glu Ile Ser Leu
290 295 300

Arg Glu Ser Leu Gln Glu Glu Leu Lys Arg Lys Lys Ile Gln Tyr Leu
305 310 315 320

Thr Arg Gly Glu Glu Ser Ser Ser Asp Thr Asn Lys Ser Ala

325 330

<210> 20

<211> 584

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Met Lys Met Ala Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe His Val

1 5 10 15

Ser Leu Phe Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ser

20 25 30

[0026]

Val Leu Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala

35 40 45

Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu

50 55 60

Leu Arg Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg

100 105 110

Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe
115 120 125

Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Ser Asp Leu His Ile Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly
145 150 155 160

Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln
165 170 175

Ile Lys Trp Ser Asp Thr Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala
180 185 190

[0027]

Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Ala Val Ala Ala Ser Val
195 200 205

Ile Met Arg Gly Ser Ser Gly Gly Gly Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn
210 215 220

Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro
225 230 235 240

Phe Phe Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ile Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu
245 250 255

Pro Ile Ser Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Phe Leu Trp Arg
260 265 270

Gln Gln Lys Glu Lys Ile Ala Leu Ser Arg Glu Thr Glu Arg Glu Arg
275 280 285

Glu Met Lys Glu Met Gly Tyr Ala Ala Thr Glu Gln Glu Ile Ser Leu
290 295 300

Arg Glu Lys Leu Gln Glu Glu Leu Lys Trp Arg Lys Ile Gln Tyr Met
305 310 315 320

Ala Arg Gly Glu Lys Ser Leu Ala Tyr His Glu Trp Lys Met Ala Leu
325 330 335

[0028] Phe Lys Pro Ala Asp Val Ile Leu Asp Pro Asp Thr Ala Asn Ala Ile
340 345 350

Leu Leu Val Ser Glu Asp Gln Arg Ser Val Gln Arg Ala Glu Glu Pro
355 360 365

Arg Asp Leu Pro Asp Asn Pro Glu Arg Phe Glu Trp Arg Tyr Cys Val
370 375 380

Leu Gly Cys Glu Asn Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu
385 390 395 400

Val Gly Asp Arg Lys Glu Trp His Ile Gly Val Cys Ser Lys Asn Val
405 410 415

Glu Arg Lys Lys Gly Trp Val Lys Met Thr Pro Glu Asn Gly Tyr Trp
420 425 430

Thr Met Gly Leu Thr Asp Gly Asn Lys Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Pro
435 440 445

Arg Thr Asn Leu Lys Leu Pro Glu Pro Pro Arg Lys Val Gly Ile Phe
450 455 460

Leu Asp Tyr Glu Thr Gly Glu Ile Ser Phe Tyr Asn Ala Thr Asp Gly
465 470 475 480

Ser His Ile Tyr Thr Phe Pro His Ala Ser Phe Ser Glu Pro Leu Tyr
485 490 495

[0029]

Pro Val Phe Arg Ile Leu Thr Leu Glu Pro Thr Ala Leu Thr Ile Cys
500 505 510

Pro Ile Pro Lys Glu Val Glu Ser Ser Pro Asp Pro Asp Leu Val Pro
515 520 525

Asp His Ser Leu Glu Thr Pro Leu Thr Pro Gly Leu Ala Asn Glu Ser
530 535 540

Gly Glu Pro Gln Ala Glu Val Thr Ser Leu Leu Leu Pro Ala His Pro
545 550 555 560

Gly Ala Glu Val Ser Pro Ser Ala Thr Thr Asn Gln Asn His Lys Leu
565 570 575

Gln Ala Arg Thr Glu Ala Leu Tyr
580

<210> 21

<211> 243

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 21

Met Gly Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Ser Phe His Val Cys Val
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gln Leu Leu Met Pro His Ser Ala Gln Phe Ala Val Val
20 25 30

[0030]

Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala Asp Leu
35 40 45

Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu Leu Arg
50 55 60

Trp Val Ser Ser Asn Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala Asp Gly
65 70 75 80

Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Ala Tyr Arg Gly Arg Thr Ser
85 90 95

Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg Ile His

100 105 110

Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe Gln Asp

115 120 125

Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Ser Asp Leu His Ile Asp Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly Gly Ile

145 150 155 160

His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln Ile Arg

165 170 175

[0031]

Trp Ser Asn Asp Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala Pro Val

180 185 190

Phe Val Asp Gly Val Gly Leu Tyr Ala Val Ala Ala Ser Val Ile Leu

195 200 205

Arg Gly Ser Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Thr Ile Arg Ser Ser Leu

210 215 220

Leu Gly Leu Glu Lys Thr Thr Ser Ile Ser Ile Ala Gly His His His

225 230 235 240

His His His

<210> 22

<211> 243

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 22

Met Gly Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe His Val Ser Phe
1 5 10 15

Phe Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ser Val Leu
 20 25 30

Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala Asp Leu
 35 40 45

[0032]

Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu Leu Arg
 50 55 60

Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala Asp Gly
65 70 75 80

Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg Thr Ser
 85 90 95

Ile Leu Arg Asp Asp Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg Ile His
 100 105 110

Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe Gln Asp
 115 120 125

Ala Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Ser Asn Leu His Val Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly Gly Ile
145 150 155 160

His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Lys Ile Gln
165 170 175

Trp Ser Asn Ala Lys Gly Gln Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala Pro Val
180 185 190

Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Ala Val Ala Ala Ser Val Ile Met
195 200 205

[0033]

Arg Gly Gly Ser Gly Glu Ser Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn Ser Val
210 215 220

Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 23

<211> 243

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 23

Met Ala Asn Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe Arg Val Cys Leu
1 5 10 15

Leu Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ala Val Leu
20 25 30

Gly Pro His Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Val Asp Leu
35 40 45

Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu Leu Arg
50 55 60

[0034]

Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ser Asp Gly
65 70 75 80

Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg Thr Ser
85 90 95

Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg Ile His
100 105 110

Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe Gln Asp
115 120 125

Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Ser Asp Leu His Ile Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly Gly Ile
145 150 155 160

His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln Ile Gln
 165 170 175

Trp Ser Asn Thr Lys Gly Gln His Ile Pro Ala Val Lys Ala Pro Val
 180 185 190

[0035] Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Ala Val Ala Ala Ser Val Ile Met
 195 200 205

Arg Gly Ser Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn Ser Leu
 210 215 220

Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Thr Asp His His His
225 230 235 240

His His His

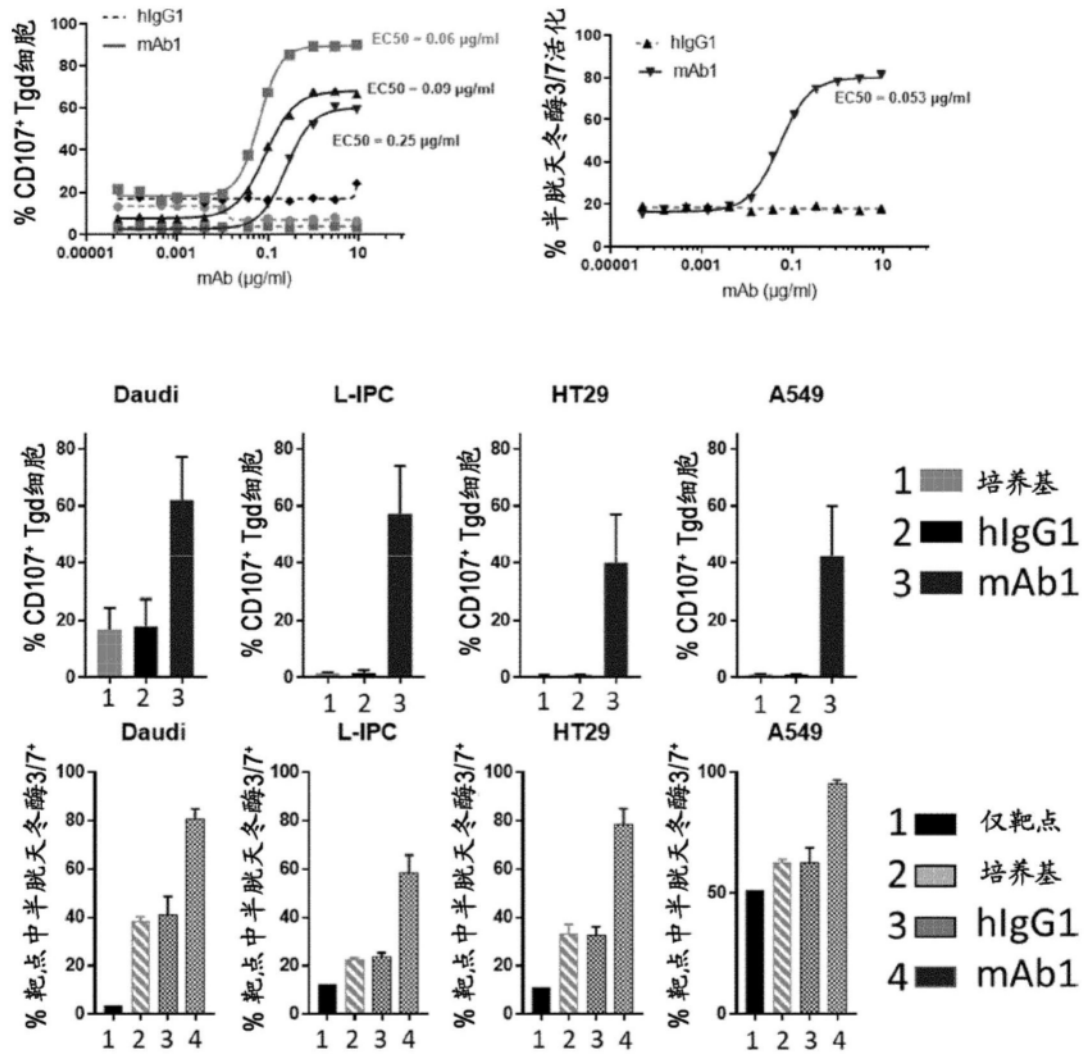


图1

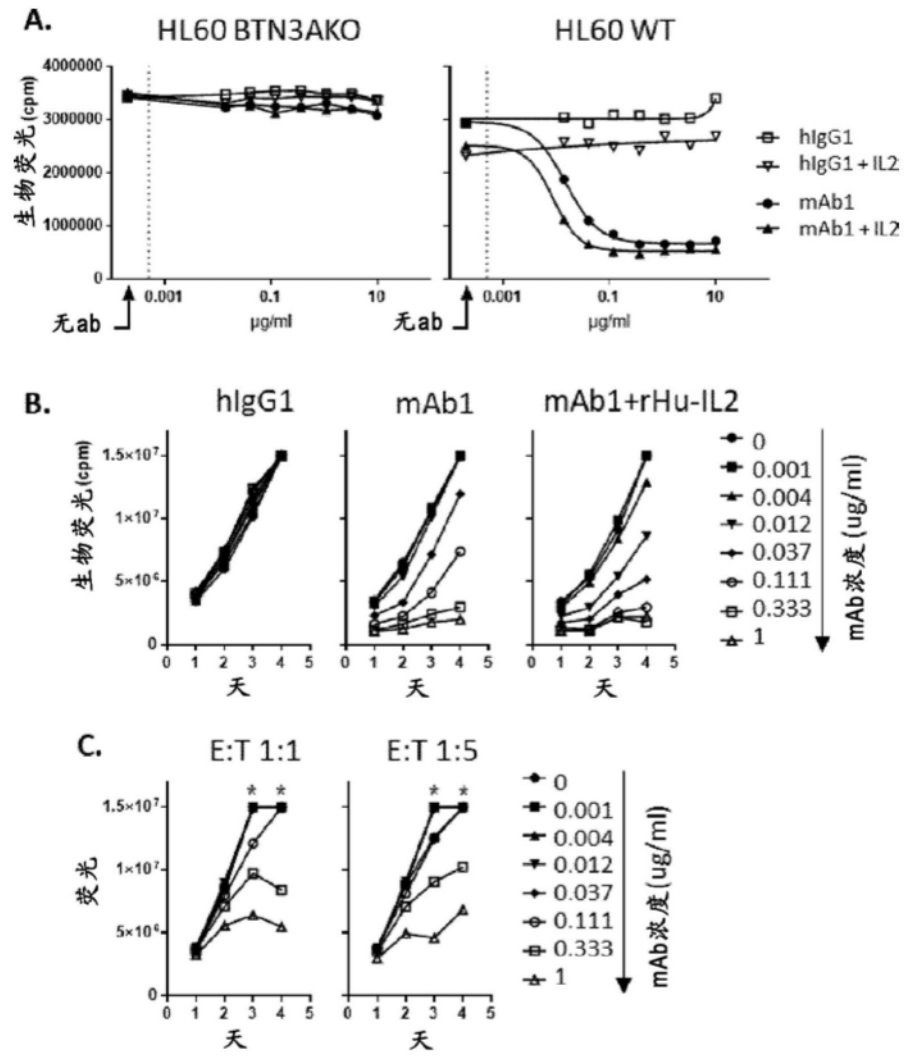


图2

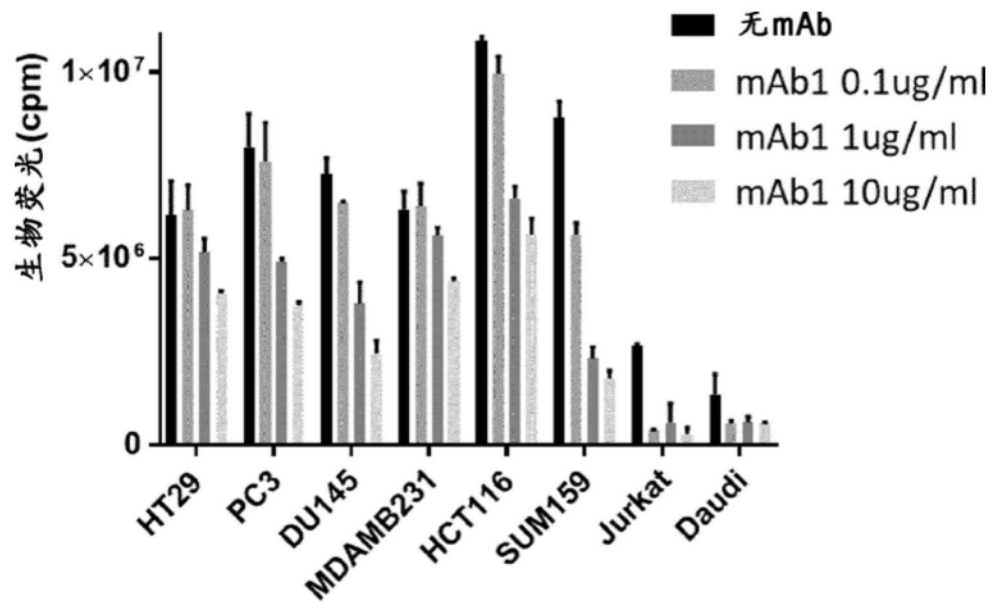


图3

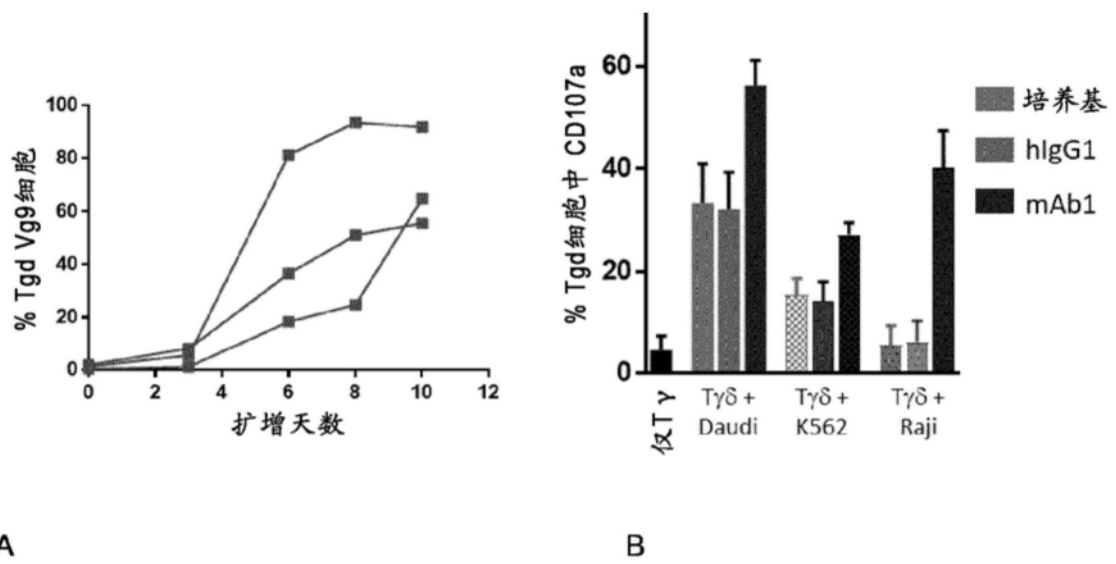


图4

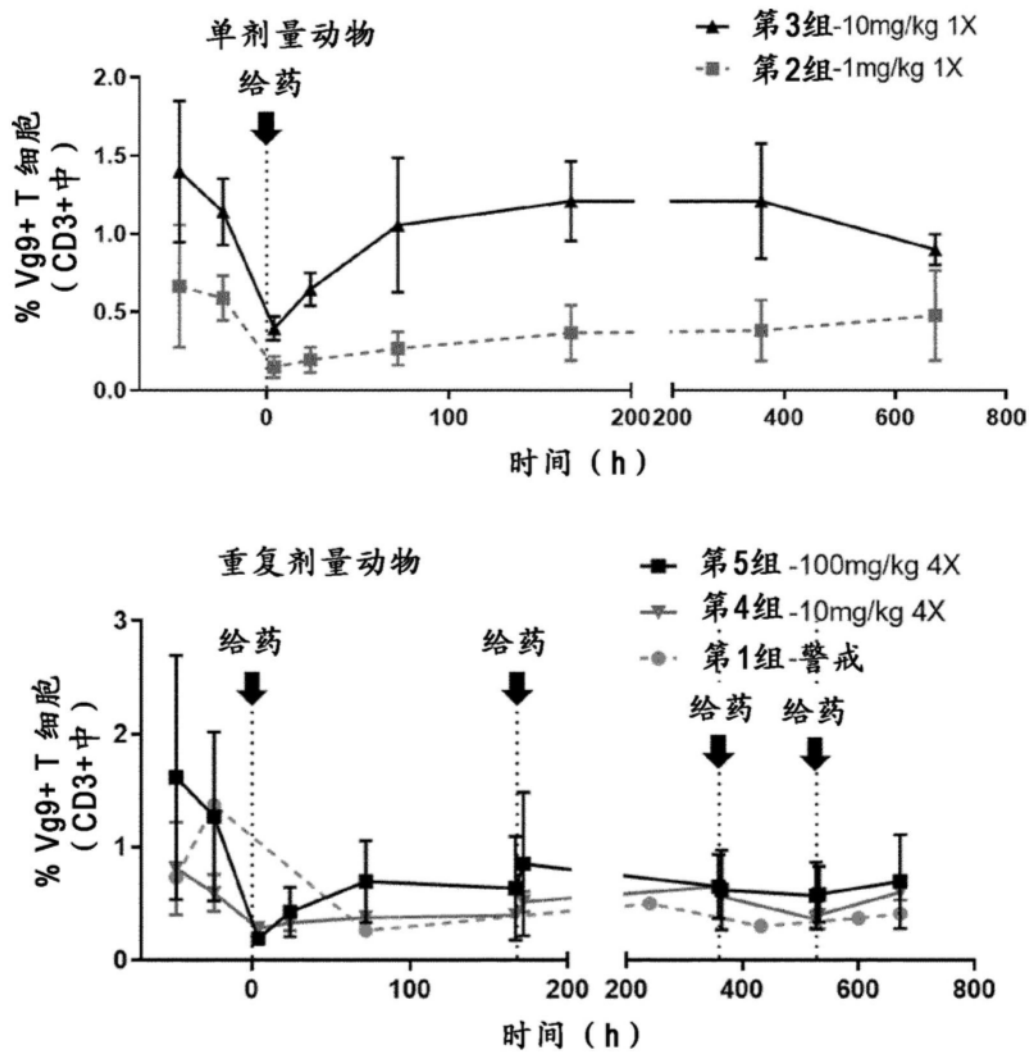


图5